

褐飞虱热激蛋白 70 在不同温度胁迫下的差异表达特性研究

单丹^{1,2,#} 王利华^{2,#} 张月亮² 韩阳春² 牛洪涛² 潘磊² 方继朝^{1,2,*}

(¹南京农业大学 植物保护学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院 植物保护研究所, 南京 210014; #共同第一作者; *通讯联系人, E-mail: fangjc126@126.com)

Induced Expression Profiles of *Hsp70s* in Brown Planthoppers, *Nilaparvata lugens*, Under Different Temperatures

SHAN Dan^{1,2,#}, WANG Lihua^{2,#}, ZHANG Yueliang², HAN Yangchun², NIU Hongtao², PAN Lei²,
FANG Jichao^{1,2,*}

(¹ College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; # These authors contributed equally to this work; *Corresponding author, E-mail: fangjc126@126.com)

Abstract: 【Objective】The brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*, is one of the major insect pests on rice in China. In recent years, the overwintering area of BPH expanded with global warming. In order to explore the response mechanisms of BPH to temperature, the *hsp70s* were cloned and the induced expression profiles of these genes were analyzed. 【Method】The nucleotide sequences of *hsp70s* were gotten from transcriptome sequencing and GenBank database, the phylogenetic tree of HSP70 was based on neighbor-joining method by MEGA4.1, and the induced expression profiles were analyzed by real-time quantitative PCR. 【Result】It was found that fifteen *hsp70* homologous genes with complete open reading frame were gotten in BPH, and 8 out of 15 genes were expressed in normal conditions or temperature stress. These eight *hsp70s* were distributed in the cytoplasm/nucleus, endoplasmic reticulum or mitochondria, and had significantly different expression in normal conditions. After 30–44°C high temperature treatment, the expression levels of KX976471, KX976473, KX976475, KX976476, KX976477 and KX976478 were up-regulated, and the maximum increased times was 1.72–245.33. However, only the expression level of KX976475 increased by 2.38 times, the other seven were not changed or even significantly decreased in expression level after 0–22°C temperature treatment. 【Conclusion】It was found that eight *hsp70s* were expressed in normal conditions or temperature stress in the cytoplasm/nucleus, endoplasmic reticulum or mitochondria. These *hsp70s* might play an important role in high temperature adaptation, but a limited role in cold adaptation in BPH.

Key words: *Nilaparvata lugens*; temperature; heat shock protein 70; induced expression

摘要:【目的】褐飞虱是我国主要水稻害虫之一, 随着全球气候变暖, 其越冬范围逐年扩大。为了明确褐飞虱对温度的适应机制, 研究了其热激蛋白 70 基因家族的组成及温度诱导表达特性。【方法】利用转录组测序和 GenBank 数据库获取热激蛋白 70 基因序列, 采用 MEGA4.1 邻接法构建进化树, 利用实时荧光定量 PCR 研究其温度诱导表达特性。【结果】筛选出与热激蛋白 70 基因同源性较高且具有完整开放阅读框的序列共 15 个, 其中 8 个在正常或温度胁迫下表达, 可能分布在细胞质/细胞核、内质网、线粒体等器官, 且本身表达丰度存在显著差异。30–44°C 高温胁迫后 KX976471、KX976473、KX976475、KX976476、KX976477 和 KX976478 等 6 个基因的表达量不同程度上调, 最大上调倍数为 1.72–245.33; 0–22°C 低温胁迫后, 除 KX976475 表达量上调 2.38 倍外, 其余基因表达量变化不显著或下降。【结论】褐飞虱 8 个热激蛋白 70 基因在正常或温度胁迫下表达, 可能分布于细胞质/核、线粒体、内质网; 在其高温适应性中可能起重要作用, 但在低温适应性中的作用有限。

关键词: 褐飞虱; 温度; 热激蛋白 70; 诱导表达

中图分类号: Q786; S435.112⁺.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2017)05-0533-09

褐飞虱是危害我国水稻的三种主要稻飞虱之一。据统计, 自 20 世纪以来, 褐飞虱在东亚的

暴发次数超过 10 次, 而且危害有加重的趋势^[1]。江苏省 2004–2013 年的 10 年间, 有 3 年褐飞

收稿日期: 2016-12-23; 修改稿收到日期: 2017-02-17。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31572004; 31301660); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20130711), 江苏省农业自主创新资金资助项目 (6111608)。

虱大发生, 3年偏重及偏重至大发生。广西省1991—2012年的22年间, 褐飞虱偏重或大发生年份竟占17年, 中等发生年份仅为5年^[2]。贵州省江口县在1977—2007年间, 大发生年份有5年, 中等偏重发生年份有5年^[3]。

褐飞虱的发生受多种因素的影响。稻田生态系统自我调节能力差、水稻品种敏感、迁入虫量大、气候适宜等是褐飞虱大发生的主要原因^[1]。褐飞虱最适发育温度为24~28℃^[4,5]。28℃时产卵量最高, 发育历期最短; 34℃是其发育的限制性高温, 该温度下卵不能孵化^[5]。褐飞虱对高温具有一定的适应性。在一定的范围内, 适当提高温度有利于褐飞虱繁殖, 促进其种群发展^[6,7]。Ghobadifar等^[8]发现, 在29~32℃气温下田间仍有褐飞虱活动; 但是发生季节连续低温抑制褐飞虱的发育, 导致低龄幼虫死亡, 使其种群数量急剧减少^[9]。

热激蛋白70是热激蛋白家族主要成员之一, 在进化上高度保守。热激蛋白70家族主要包括4个成员, 分别是诱导性热激蛋白70、组成型热激蛋白70、葡萄糖调节蛋白78和GRP75^[10]。其中, 诱导性热激蛋白70正常情况下不表达或者低表达, 但在温度等胁迫因子处理后, 其表达量急剧上升; 组成型热激蛋白70在正常环境下表达, 在温度等胁迫因子作用下, 其表达量轻微上升或不变; 葡萄糖调节蛋白78主要位于内质网; GRP75主要位于线粒体内^[10]。热激蛋白70在生物对温度胁迫的抗性中起重要作用。如苹果实蝇、始红蜡热激蛋白70表达量增加使其对高温或低温的耐受性增强^[11,12]。为了明确褐飞虱对温度胁迫的适应机制, 本研究筛选并克隆了正常或温度胁迫下表达的热激蛋白70家族基因序列, 比较了这些基因在高温和低温处理后的表达特性, 以期了解温度胁迫下褐飞虱种群发展的内在机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试褐飞虱

供试褐飞虱于2006年采自南京, 室内采用武运粳7号饲养, 饲养条件如下: 温度27±1℃, 相对湿度为65%, 光周期为14h光照/10h黑暗。

1.2 热激蛋白70基因的筛选

褐飞虱热激蛋白70基因序列来源于转录组数据库。首先根据基因注释, 从我们测定的褐飞虱转录组数据库中筛选热激蛋白70基因, 然后再根据基因同源性搜索GenBank褐飞虱转录组数据库,

获得已登录的热激蛋白70基因序列。在获得这些序列后, 采用Sequencher 4.7组装排除重复序列。

1.3 褐飞虱温度相关热激蛋白70基因的克隆和序列分析

分别采用39℃、14℃温度处理褐飞虱, 收集处理1h试虫和未处理试虫, 提取总RNA。总RNA提取参照Promega公司的总RNA提取试剂盒(SV Total RNA Isolation System)说明书进行。将液氮速冻试虫研磨后加入175 μL裂解液, 然后加入350 μL RNA稀释缓冲液, 70℃下3 min后, 4℃下离心20 min。然后过柱、加入DNA酶后漂洗; 最后加入100 μL无核酸酶的双蒸水洗脱。提取总RNA后使用1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计(Eppendorf BioPhotometer Plus)检测RNA的完整性、纯度与浓度, -80℃下超低温冰箱贮存。

热激蛋白70基因克隆时将39℃、14℃温度处理和对照总RNA等比例混合, 反转录成cDNA, 然后根据热激蛋白70基因序列, 设计引物, 克隆温度相关的热激蛋白70基因。采用ScanProsite分析克隆序列的保守区域, 预测其等电点、分子量等, 采用DNAssist进行序列比对, 利用Mega 4.1构建分子进化树。

1.4 热激蛋白70基因表达量分析

1.4.1 试虫处理

褐飞虱热激蛋白70基因丰度分析时, 试虫直接取羽化1d的雌成虫, 提总RNA, 然后进行qPCR分析。

温度诱导热激蛋白70基因表达特性分析时, 收集羽化1d雌成虫, 分别在低温0、6、10、14、18、22℃和高温30、33、36、39、42、44℃下处理1h, 26℃恢复1h, 液氮速冻后存于-80℃冰箱, 用于总RNA提取。每处理3次重复, 每重复6头。

1.4.2 总RNA提取

总RNA提取采用Promega公司总RNA提取试剂盒(SV Total RNA Isolation System)进行。方法与1.3同。在微量分光光度计测定RNA的浓度后, 根据浓度计算cDNA第1链合成时所需的模板体积。

1.4.3 cDNA第1链的合成

cDNA第1链的合成采用TaKaRa的实时定量PCR反转录试剂盒[PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)]进行。根据试剂盒说明书, 以500 ng总RNA为模板, 加入2 μL含反转录酶预混液(5×PrimeScript RT Master Mix), 然后以无RNA酶双蒸水补至10 μL, 37℃下温育30 min, 85℃下10s灭活反转录酶即得到第1链cDNA。

表 1 褐飞虱热激蛋白 70 基因 qPCR 引物序列

Table 1. Primer sequences of heat shock protein 70 genes for qPCR in *N. lugens*.

基因登录号 Accession number	上游引物 (5' -3') Forward primer (5' -3')	下游引物 (5' -3') Reverse primer (5' -3')
KX976471	CTCAGCGTCAAGCAACCAAAG	AAGGTACCACCACCCAAATCG
KX976472	ATTCTACAGGTGTCAGCCG	CGCCTACTCACTCAAGAA
KX976473	TGAAAGAGCAAAGAGGACAC	TGATTGATAGGTTGAGAGAC
KX976474	TGAGGTGGATGTCAACGGTA	TTCTGCCTCCATAATCATCT
KX976475	GACCAAAGACAACAACCTGC	GGATGGTGATTTTCTCGGAT
KX976476	CACACGAAGACAATCAGCCT	CATTCAAAATACCATCCGCA
KX976477	GTCAGTGAATGCTCCTGCT	CCACCTGCGTCTGACCGTCG
KX976478	CCATTACCATTGCGTCTG	GGAAAGCGAGAAAAAGGA
Ref genes	TGTCTCTCACAGTCCCCATCT	GTCAAGTCACGACCAGCCAAG

表 2 从转录组数据库筛选到的褐飞虱热激蛋白 70 基因

Table 2. Heat shock protein 70 genes of *N. lugens* screened from transcriptomic database.

GenBank 登录号 Accession number	开放阅读框碱基数 Nucleotide base number of ORF	热激蛋白 70 来源 Organisms of Hsp70s	相似性 Identity/%
GANM01000978.1	1965	<i>Nilaparvata lugens</i>	99
GAYF02039790.1	2028	<i>Laodelphax striatella</i>	99
GAYF02024329.1	2031	<i>Aschersonia aleyrodis</i>	86
GAYF02024558.1	2013	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	97
GAYF02029723.1	2007	<i>Conidiobolus coronatus</i>	99
GAYF02024777.1	2001	<i>Hirsutella minnesotensis</i>	87
GANM01002476.1	1875	<i>Bemisia tabaci</i>	81
GAYF02029340.1	1962	<i>Rhopalosiphum padi</i>	100
GAYF02028552.1	1848	<i>Mortierella verticillata</i>	76
GAYF02028886.1	1968	<i>Spizellomyces punctatus</i>	87
GANM01005448.1	1896	<i>N. lugens</i>	99
GAYF02024579.1	1884	<i>Amyeloides transitella</i>	70
GANM01021225.1	2070	<i>L. striatella</i>	95
GAYF02031278.1	1932	<i>Lygus hesperus</i>	84
N1400	1845	<i>Hirsutella minnesotensis</i>	95

1.4.4 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(qPCR)参考王利华等^[13]的方法进行,以 β -actin(EU179846)为内参^[14],取 1 μ L 稀释 20 倍的 cDNA 为模板,分别加入 10 μ L 含 Taq 酶的 qPCR 预混液[SYBR[®] Premix Ex Taq[™]、0.4 μ L ROX Reference Dye (50 \times)、和 0.4 μ L 10 μ mol/L 上游和下游引物(引物序列见表 1),以水补至 20 μ L。先 95 $^{\circ}$ C 下预变性 30 s,然后 95 $^{\circ}$ C 下 5 s,60 $^{\circ}$ C 下 31 s,共 40 个循环,最后进行溶解曲线的扩增。

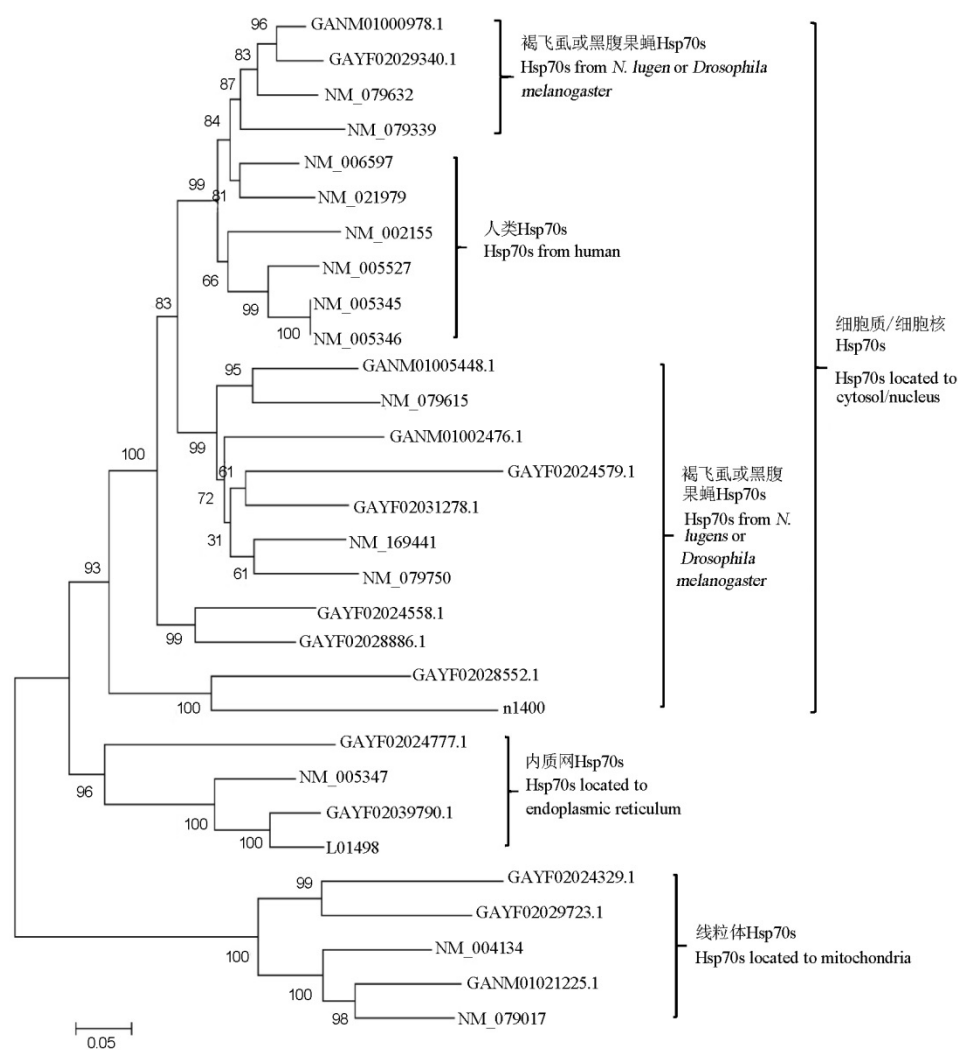
1.5 数据分析

热激蛋白相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[15]。丰度比较时,以表达量最低的基因为对照,分别计算其他 7 个基因的相对表达量。温度诱导表达量的计算以正常饲养试虫为对照,结果采用 SPSS 19.0 ANOVA 进行方差分析,最小显著性差异法在 0.05 水平上进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 热激蛋白 70 基因筛选

从 GenBank 转录组数据库获得与热激蛋白 70 同源性超过 70%的基因序列 22 个,我们测定的转录组数据注释为热激蛋白 70 的序列共 12 个,排除重复序列后发现具有完整 ORF 的热激蛋白 70 基因共 15 个,其中 GANM01000978.1 等 14 个基因可以在 GenBank 转录组数据库中找到同源序列, N1400 首次在褐飞虱中发现。这些基因与热激蛋白 70 基因的氨基酸同源性最高达到 100% (表 2)。进化树分析结果显示同一物种不同组织间热激蛋白 70 的同源性低于不同物种相同组织。GAYF02039790.1、GAYF02024777.1 与果蝇和人类的内质网热激蛋白 70 序列聚为一类, GAYF02024329.1、GAYF02029723.1 和 GANM01021225.1 与线粒体



NM_006597、NM_0021979、NM_002155、NM_005527、NM_005345、NM_005346、NM_005347、NM_004134 来自人类。NM_079632、NM_079632、NM_079339、NM_079615、NM_169441、NM_079750、L01496、NM_079017 来自黑腹果蝇。
The hsp70s of NM_006597, NM_0021979, NM_002155, NM_005527, NM_005345, NM_005346, NM_005347, NM_004134 are from *H. sapiens*, and NM_079632, NM_079632, NM_079339, NM_079615, NM_169441, NM_079750, L01496, NM_079017 are from *D. melanogaster*.

图1 褐飞虱与黑腹果蝇和人类的热激蛋白 70 的进化树

Fig.1. Phylogenetic tree of HSP70 from *N. lugens*, *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster* based on Neighbor-Joining method.

表3 褐飞虱正常或温度胁迫下表达的热激蛋白 70 序列及特征

Table 3. Heat shock protein 70 genes cloned from *N. lugens* reared in normal condition or treated by high temperature stress.

GenBank 登录号 Accession number	NCBI 转录组同源基因 Homologues in transcriptomic submitted to NCBI	相似性 Identity/%	理论等电点 Theoretical pI of encoded protein	分子量 Molecular weight of Encoded protein	ATPase 位置 The location of ATPase domain/bp
KX976471	GANM01000978.1	99.5	5.46	71422.69	6-383
KX976472	GAYF02039790.1	98.3	5.45	75283.42	28-405
KX976473	GAYF02031278.1	95.3	5.63	70661.89	7-384
KX976474	-	-	5.39	66801.97	9-386
KX976475	GANM01005448.1	98.8	5.84	69010.35	6-384
KX976476	GAYF02024579.1	99.7	5.23	69705.43	6-384
KX976477	GANM01021225.1	99.5	5.78	74812.09	59-433
KX976478	GAYF02024329.1	99.8	6.15	73462.19	50-423

热激蛋白 70 聚为一类 (图 1)。

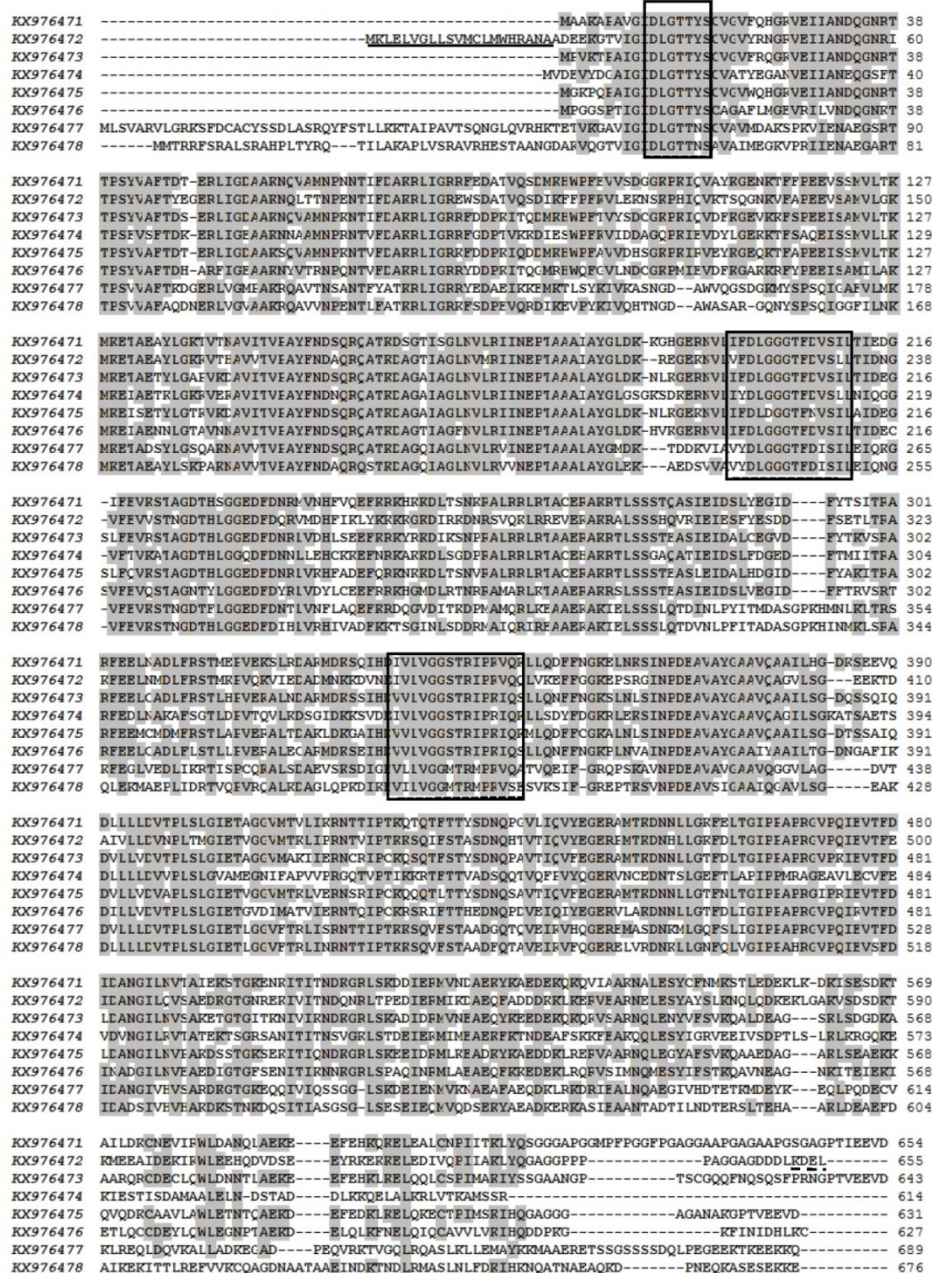
2.2 褐飞虱正常或温度胁迫下表达的热激蛋白 70 基因克隆及序列分析

RT-PCR 结果表明在正常或温度胁迫后, 褐飞虱体内表达的热激蛋白 70 基因共有 8 个, 基因登录号为 KX976471-8。与 NCBI 转录组数据库中相关重复序列的相似性为 95.3%~99.8%。预测这些基因编码的蛋白质分子量为 66 801.97~75 283.42, 等电

点为 4.94~6.15 (表 3)。所有基因都含有热激蛋白 70 的三个标志性序列, N 端有 ATPase 结构域。KX976472 C 端还有内质网靶向序列, N 端含有信号肽序列 (图 2)。KX976477、KX976478 与其他 6 个基因相比 N 端 ATPase 结合区域前具有更长的碱基序列。

2.3 热激蛋白 70 的丰度比较

褐飞虱热激蛋白 70 的丰度如图 3 所示。正常



“—”表示信号肽; “□”表示热激蛋白 70 的 3 个保守区域; “---”表示内质网靶向序列。

“—” marks the signal peptide of HSP70 located in endoplasmic reticulum; “□” marks three signatures of hsp70s; “---” marks the endoplasmic reticulum retention signal.

图 2 克隆的褐飞虱热激蛋白 70 氨基酸序列比对

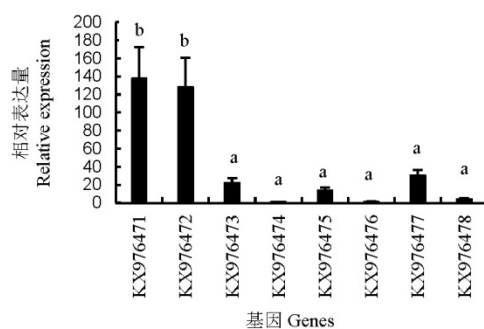
Fig. 2. Amino acid alignment of heat shock protein 70 cloned from *N. lugens*.

情况下, 8 个热激蛋白基因的表达存在显著差异。按从高到低的顺序排列依次为 KX976471> KX976472> KX976477> KX976473> KX976475> KX976478> KX976476> KX976474。ANOVA 数据分析结果显示 KX976471 和 KX976472 的表达量显著高于其他 6 个热激蛋白 70 基因。

2.4 温度对热激蛋白 70 的诱导

2.4.1 高温对热激蛋白 70 的诱导

30~44℃ 高温处理后, 褐飞虱热激蛋白 70 的表达量存在显著差异, KX976473 和 KX976476 表达显著上升, 尤其是 KX976473, 在 42~44℃ 处理后, 其表达量提高 200 倍以上。KX976472 和 KX976474 在处理前后表达量无显著变化。其余 4 个基因 KX976471、KX976475、KX976477 和 KX976478

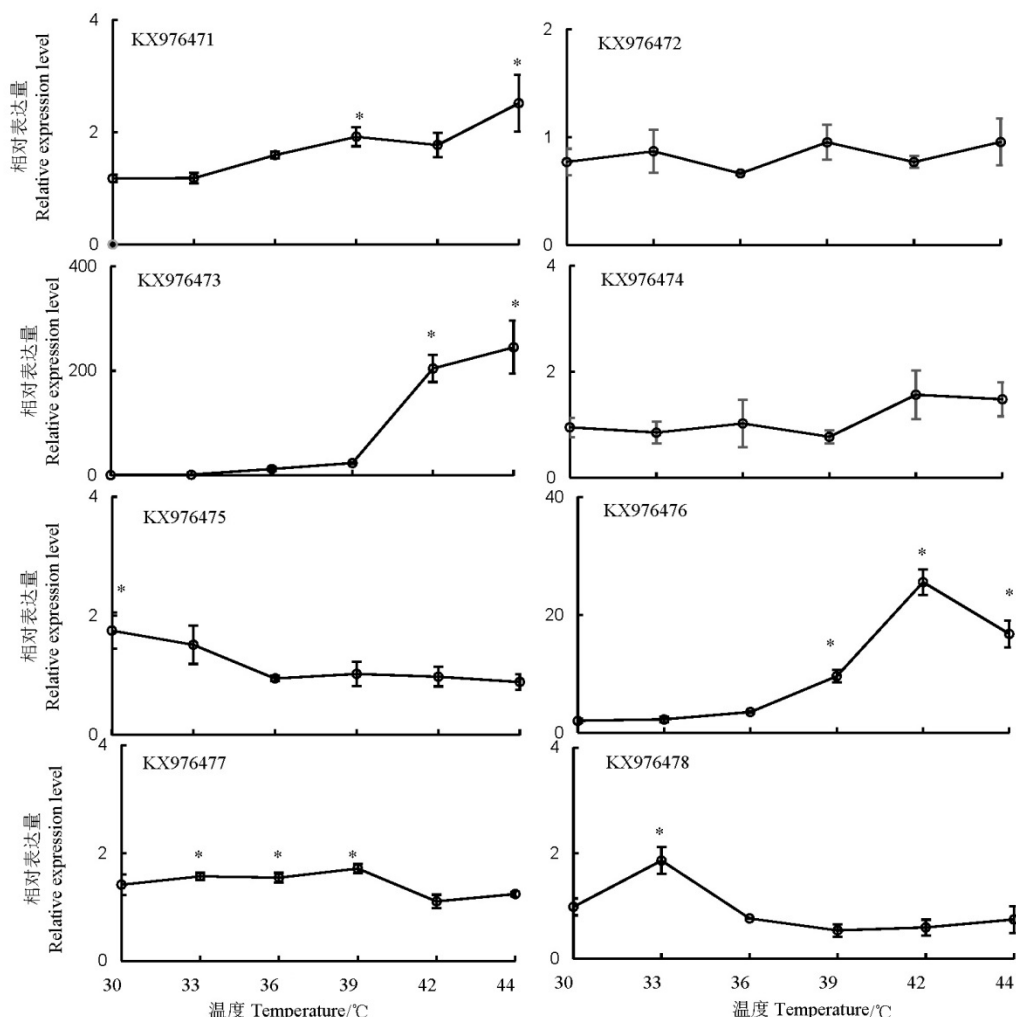


柱上不同字母表示在 0.05 水平上存在显著差异

Different letter above the bars means significant difference at 0.05 level.

图 3 褐飞虱热激蛋白 70 丰度分析

Fig. 3. Comparison of abundance of heat shock protein 70 cloned from *N. lugens*.



*表示在 0.05 水平上存在显著差异。图 5 同。

*means significant difference at 0.05 level. The same as in Fig.5.

图 4 高温胁迫对褐飞虱热激蛋白 70 基因表达量的诱导

Fig. 4. Expression of heat shock protein 70 genes induced by high temperature in *N. lugens*.

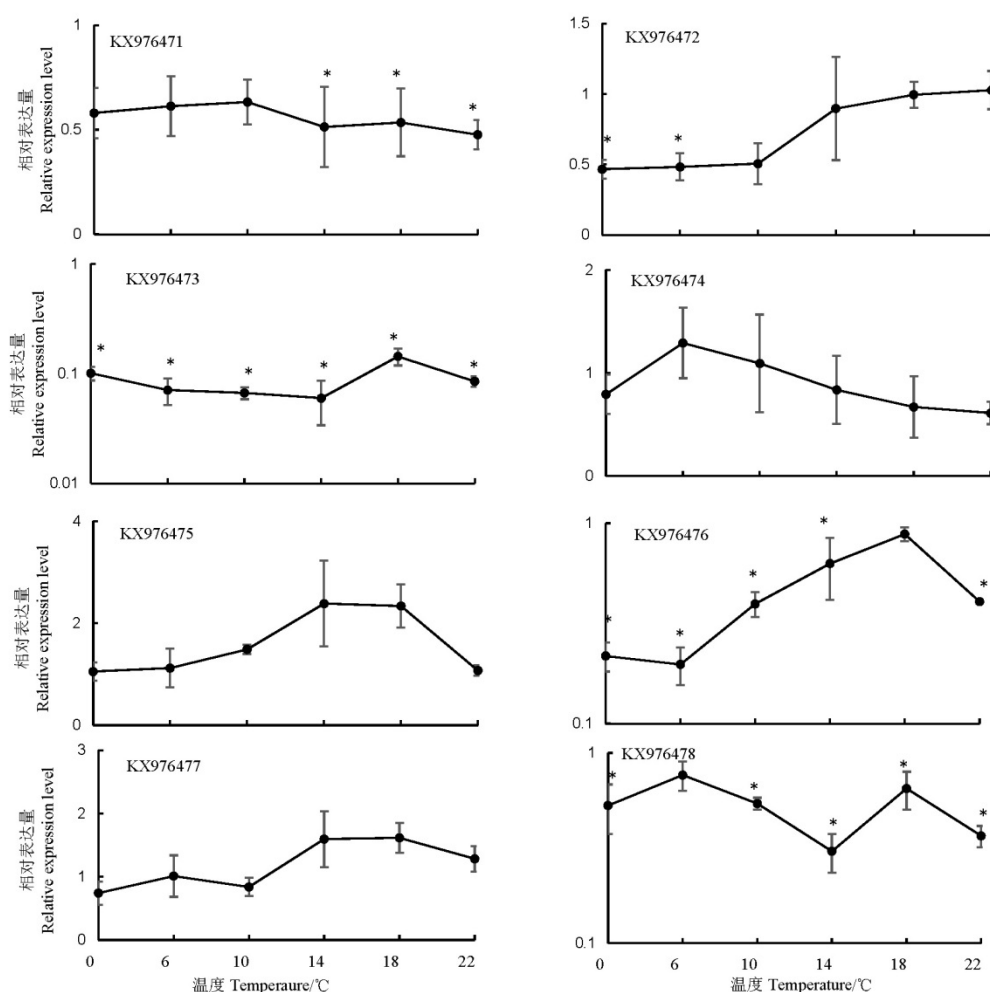


图5 低温胁迫对褐飞虱热激蛋白 70 基因表达量的诱导

Fig. 5. Expression of heat shock protein 70 genes induced by low temperatures in *N. lugens*.

分别在 44、30、39、33°C 具有最高表达量,但是上升倍数均小于 3 倍(图 4)。

2.4.2 低温对热激蛋白 70 的诱导

低温胁迫对褐飞虱热激蛋白 70 表达的影响与高温胁迫存在显著差异。0~22°C 低温胁迫后,除 KX976475 的表达量在 14°C 上升 2.38 倍外, KX976474 和 KX976477 的表达量变化不显著,其余 5 个基因 KX976471、KX976472、KX976473、KX976476 和 KX976478 的表达被抑制,尤其是 KX976473 在 14°C 处理后,表达量下降约 17 倍(图 5)。

3 讨论

昆虫热激蛋白 70 家族成员数量在不同种间差异较大。如家蚕(*Bombyx mori*)有 10 个热激蛋白 70

基因,其中 4 个为诱导型,6 个为组成型^[16]。珍珠边豹纹蝶(*Glanville fritillary*)有 7 个热激蛋白 70 基因,其中 1 个可能位于内质网,6 个位于细胞质^[17]。褐飞虱热激蛋白 70 家族至少包括 15 个成员,2 个可能位于内质网,3 个位于线粒体,其余位于细胞质或细胞核。位于内质网和线粒体的热激蛋白 70 与一般热激蛋白 70 的亲缘关系较远,其遗传距离大于不同物种间相同器官来源的热激蛋白 70,这与果蝇热激蛋白 70 进化特征一致^[18]。

正常和温度胁迫下表达的褐飞虱热激蛋白 70 基因有 8 个,其中 KX976473 和 KX976476 为诱导型热激蛋白 70, KX976472 位于内质网, KX976477 和 KX976478 位于线粒体,其余 4 个基因为组成型热激蛋白 70。以温度胁迫和正常试虫混合 cDNA 为模板,尚有 7 个热激蛋白 70 基因没有克隆出来。这可能有两方面的原因。一是这些基因表达丰度很

低,在检测下限之下;二是这些基因可能与温度胁迫保护无关,而是对温度以外的其他胁迫因子负责。

热激蛋白 70 在生物应对高温、农药等环境胁迫中起重要作用^[19]。研究发现害虫如梨小食心虫(*Grapholita molesta*)、珍珠边豹纹蝶、柑桔红螨(*Panonychus citri*)、三叶草斑潜蝇(*Liriomyza trifolii*)、烟粉虱(*Bemisia tabaci*)、苹果蠹蛾(*Cydia pomonella*)、臭虫(*Cimex lectularius*)等热激蛋白 70 与其温度适应性有关,在温度胁迫后表达量急剧上升^[17,20-25]。

而且不同器官来源的热激蛋白 70 在减少胁迫伤害中具有一定的协同作用,如内质网和细胞质热激蛋白 70 通过协同作用提高机体对高温的适应性^[26]。线粒体热激蛋白 70 (PnHSP70)在生物高温、盐、干旱等环境胁迫保护中也起重要作用^[27]。高温胁迫后,褐飞虱线粒体热激蛋白和细胞质/细胞核热激蛋白 70 表达量不同程度上升,可能促进其对高温的适应。

热激蛋白 70 家族不同成员具有不同的胁迫保护谱。苹果蠹蛾 *CpHsp70-1* 对高温胁迫具有保护作用,在高温胁迫后表达量显著上升,但对杀虫剂胁迫不敏感^[20]。珍珠边豹纹蝶 *Hsp70* 和 *Hsc70* 在高温热激后表达量显著上升,但低温胁迫后, *Hsp70* 表达量不变, *Hsc70* 表达量仅轻微上升^[17]。西花蓟马 *Fo-HSP70* 的表达量与诱导温度有关;0℃胁迫时表达量显著上升;-4℃胁迫其表达量显著下降;31~46℃高温胁迫其表达量显著上升^[28]。柑桔红螨 3 个热激蛋白 70 基因对冷胁迫无反应,但 *PcHsp70-2* 在热激后表达上调^[22]。褐飞虱 *Nlhsc70* 在高温胁迫后表达量显著上升,但低温胁迫后表达量变化不大^[29]。本研究发现褐飞虱 8 个热激蛋白 70 中,仅有 2 个对高温胁迫不敏感,其余 6 个基因在高温处理后其表达量不同程度上升;而低温胁迫后,除 1 个基因表达量轻微上调外,其余基因表达下降或无显著变化。尤其是 KX976473 在高温胁迫时表达量急剧上升,但低温胁迫时显著下降。这些结果说明褐飞虱高温和低温胁迫的保护机制可能存在差异,热激蛋白 70 在褐飞虱高温胁迫保护中起重要作用,但在低温胁迫伤害中的作用不大。这可能与褐飞虱的生物学特性有关。褐飞虱是一种迁飞性害虫,其越冬北界随各年冬季气温高低而摆动于北纬 21~25℃间,这些地区冬季日均最低气温在 15℃左右,所以褐飞虱野外生存中一般不需应对极端低温,因此,在进化上较少保留应对低温胁迫的基因。

综上所述,本研究通过转录组获取了 15 个褐飞虱热激蛋白 70 基因,其中 8 个可能与其温度适应性有关。这些与温度相关的热激蛋白 70 基因可

能分布在细胞质/细胞核、内质网、线粒体等器官,在褐飞虱温度适应性中起不同的作用。正常情况或温度胁迫后,这些基因的表达量存在显著差异。大部分基因在高温胁迫后表达量上升,低温胁迫后下降或无变化,说明这些热激蛋白 70 基因在高温胁迫中可能起重要作用,但对低温胁迫不敏感。

参考文献:

- [1] Cheng J A. Rice Planthoppers in the Past Half Century in China. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2014: 1-33.
- [2] 唐广田,包云轩. 广西褐飞虱发生特点及其迁飞路径分析. 中国农业气象, 2015, 36(1): 74-82.
Tang G T, Bao Y X. Analysis on occurrence pattern and migratory paths of brown plant-hopper in Guangxi Province. *Chin J Agrometeorol*, 2015, 36(1):74-82. (in Chinese with English abstract)
- [3] 闫香慧,刘怀,赵志模,何恒果,代建平,程登发. 水稻褐飞虱灯下发生期及种群数量动态分析. 植物保护学报, 2008, 35(6): 501-506.
Yan X H, Liu H, Zhao Z M, He H G, Dai J P, Cheng D F. Population dynamics and occurrence period of brown planthoppers based on the historic data analysis of light trap catches. *J Plant Prot*, 2008, 35(6): 501-506.(in Chinese with English abstract)
- [4] 祝树德,陆自强,杭杉保,徐海. 温度对褐飞虱种群调控作用研究. 华东昆虫学报, 1994, 3(1): 53-59.
Zhu S D, Lu Z Q, Hang S B, Xu H. Study of the temperature regulation on brown planthopper population. *Entomol J East China*, 1994, 3(1): 53-59. (in Chinese with English abstract)
- [5] 石保坤,胡朝兴,黄建利,侯茂林. 温度对褐飞虱发育、存活和产卵影响的关系模型. 生态学报, 2014, 34(20): 5868-5874.
Shi B K, Hu C X, Huang J L, Hou M L. Modeling the influence of temperature on development, survival and oviposition of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Acta Ecol Sin*, 2014, 34(20): 5868-5874. (in Chinese with English abstract)
- [6] Shi B K, Huang J L, Hu C X, Hou M L. Interactive Effects of Elevated CO₂ and Temperature on Rice Planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J Integ Agric*, 2014, 13(7): 1520-1529.
- [7] Pandi G G P, Chander S, Singh M .P, Pathak H. Impact of Elevated CO₂ and temperature on brown planthopper population in rice ecosystem. *Proc Nat Acad Sci, India Sec B: Biol Sci*, 2016: 1-8.
- [8] Ghobadifar F, Aimrun W, Jebur M N. Development of an early warning system for brown planthopper (BPH) (*Nilaparvata lugens*) in rice farming using multispectral remote sensing. *Prec Agric*, 2016, 17(4): 377-391.
- [9] 彭兆普,马明勇,傅强,李一波,邓龙飞. 湖南近三年褐飞虱发生规律研究. 植物保护, 2012, 38(4): 147-151.
Peng Z P, Ma M Y, Fu Q, Li Y B, Deng L F. Occurrence

- of the brown planthopper in Hunan Province in recent years. *Plant Prot*, 2012, 38(4): 147-151. (in Chinese with English abstract)
- [10] Dugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*, 2007, 581(19): 3702-3710.
- [11] Vladimir K, Michaela T B. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Plos One*, 2009, 4(2): e4546.
- [12] Giancarlo L, Davidl D. Regulation of heat shock proteins in the apple maggot *Rhagoletis pomonella* during hot summer days and overwintering diapause. *Physiol Entomol*, 2008, 33(4): 346-352.
- [13] 王利华, 单丹, 方继朝. 灰飞虱 LHSC70 基因表达特性及功能研究. 中国水稻科学, 2015, 29(4): 424-430.
Wang L H, Shan D, Fang J C. Expression profiling and function analyses of LHSC70 in *Laodelphax striatellus*. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(4): 424-430. (in Chinese with English abstract)
- [14] Jiang J J, Huang L F, Chen H S, et al. Identification of reference genes and expression analysis of heat shock protein genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), after exposure to heat stress. *Acta Entomol Sin*, 2015, 58(5): 479-486.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Lin H J, Li Z, Dang X Q, Su W J, Zhou Z Y. Short-term increased expression of the heat shock protein 70 family members during heat shock is positively correlated with basal thermotolerance in the midgut of three strains of the silkworm. *Bombyx mori*. *African Entomol*, 2009, 22(1): 24-29.
- [17] Luo S, Ahola V, Shu C, Xu C, Wang R. Heat shock protein 70 gene family in the *Glanville fritillary* butterfly and their response to thermal stress. *Gene*, 2015, 556(2): 132-141.
- [18] Rubin D M, Mehta A D, Zhu J, Shoham S, Chen X, Wells Q R, Palter K B. Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. *Gene*, 1993, 128(2): 155-163.
- [19] Wang L, Shan D, Zhang Y, Liu X, Sun Y, Zhang Z, Fang J C. Effects of high temperature on life history traits and heat shock protein expression in chlorpyrifos-resistant *Laodelphax striatella*. *Pestic Biochem Physiol*, 2017, 136: 64-69.
- [20] Yang X Q, Wu Z W, Zhang Y L, Barrosparada W. Toxicity of six insecticides on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) and effect on expression of detoxification genes. *J Econ Entomol*, 2016, 109(1): 320-326.
- [21] Chen H, Xu X L, Li Y P, Wu J X. Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperatures in adults of *Grapholita molesta* (Busck). *Insect Sci*, 2014, 21(4): 439-448.
- [22] Yang L H, Jiang H B, Liu Y H, Dou W, Wang J J. Molecular characterization of three heat shock protein 70 genes and their expression profiles under thermal stress in the citrus red mite. *Mol Biol Reports*, 2012, 39(4): 3585-3596.
- [23] 郑丹, 崔旭红, 李红亮, 蔡冲, 高永生, 商晗武. 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, 2010, 37(2): 159-164.
Zheng D, Cui X H, Li H L, Cai C, Gao Y S, Shang H W. Cloning of heat shock protein gene, *hsp70*, in *Liriomyza trifolii* and its expression under temperature stress. *J Plant Prot*, 2016, 37(2): 159-164. (in Chinese with English abstract)
- [24] 崔旭红, 谢明, 万方浩. 高温胁迫下 B 型烟粉虱热激蛋白基因 hsp70 表达量的变. 昆虫学报, 2007, 50(11): 1087-1091.
Cui X H, Xie M, Wang F H. Changes in expression level of heat shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomol Sin*, 2007, 50(11): 1087-1091. (in Chinese with English abstract)
- [25] Benoit J B, Lopez-Martinez G, Teets N M, Phillips S A, Denlinger D L. Responses of the bed bug, *Cimex lectularius*, to temperature extremes and dehydration: Levels of tolerance, rapid cold hardening and expression of heat shock proteins. *Med Veterin Entomol*, 2009, 23(4): 418-425.
- [26] Xu X, Gupta S, Hu W, Mcgrath B C, Cavener D R. Hyperthermia Induces the ER Stress Pathway. *PloS One*, 2011, 6(8): 366-366.
- [27] Liu S, Wang J, Cong B, Huang X H, Chen K S, Zhang P Y. Characterization and expression analysis of a mitochondrial heat shock protein 70 gene from the Antarctic moss *Pohlia nutans*. *Polar Biol*, 2014, 37(8): 1145-1155.
- [28] Wang H H, Reitz S R, Wang L X, Wang S Y, Li X, Lei Z R. The mRNA expression profiles of five heat shock protein genes from *Frankliniella occidentalis* at different stages and their responses to temperatures and insecticides. *J Integr Agric*, 2014, 13(10): 2196-221.
- [29] Lu K, Chen X, Liu W, Zhou Q. Characterization of heat shock cognate protein 70 gene and its differential expression in response to thermal stress between two wing morphs of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2016, 199: 47-53.