草地贪夜蛾热激蛋白*Hsc70*基因克隆、表达谱及对不同环境胁迫的响应

姚梦霜[1] 孟建玉[2] 杨昌利[1] 张长禹[1*]

（1. 贵州大学昆虫研究所，贵州省山地农业病虫害重点实验室，贵阳 550025；
2. 贵州省烟草科学研究院，贵阳 550081）

摘要：为探讨草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda Hsc70*基因对A区段紫外辐射（ultraviolet-A radiation，UV-A）及高、低温胁迫的响应，采用逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）技术克隆*Hsc70*基因并对其进行序列分析，利用实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）技术分析不同龄期、不同组织及UV-A和高、低温胁迫下的表达量。结果显示，草地贪夜蛾*Hsc70*基因（GenBank登录号：MT130717）开放阅读框为1 980 bp，编码659个氨基酸，蛋白质相对分子量为73.12 kD，等电点为5.23；其氨基酸末端序列为KDEL，属于内质网型热激蛋白。草地贪夜蛾*Hsc70*基因与鳞翅目昆虫*Hsc70*同源性高。草地贪夜蛾*Hsc70*表达量在2龄幼虫发育阶段和复眼中表达量最高。UV-A、高、低温胁迫对草地贪夜蛾*Hsc70*基因表达有明显的诱导作用，随着处理时间的延长，*Hsc70*基因表达量呈先增加后降低的趋势；UV-A胁迫下，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因表达量分别在120 min和60 min时达到峰值；36℃胁迫下，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因表达量分别在120 min和90 min时达到峰值；4℃胁迫下，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因表达量均在30 min时达到峰值。表明草地贪夜蛾*Hsc70*基因在草地贪夜蛾适应环境胁迫中发挥着作用。

关键词：草地贪夜蛾；*Hsc70*；基因；克隆；表达分析

cDNA cloning and expression profiling of the heat shock prote in *Hsc*70 gene and its response to different environmental stresses in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*

YAO Mengshuang[1] MENG Jianyu[2] YANG Changli[1] ZHANG Changyu[1*]

（1. Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2. Guizhou Research Institute of Tobacco Sciences, Guiyang 550081, Guizhou Province, China）

Abstract: To investigate the molecular mechanism of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in response to UV-A radiation, temperature stresses of high and low, the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to the cDNA of *Hsc70* gene from *S. frugiperda*, and the cDNA sequence were analyzed. To explore the expression differences of *Hsc70* gene from *S. frugiperda* in different developmental stages, in different tissues and under UV-A, high and low temperature stresses, the expression level of *Hsc70* gene were investigated by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed the open reading frame of the *Hsc70* gene from *S. frugiperda* (GenBank accession no.:

基金项目：国家重点研发计划（2017YFD0200900），国家自然科学基金（31401754），中国烟草总公司贵州省公司科技项目（中烟黔科[2019]7号）
* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zcy1121@aliyun.com
收稿日期：2020-03-10

MT13071) is 1 980 bp, and 659 amino acids of encoding. The relative molecular of its putative protein is 73.12 kD with an isoelectric point (pI) of 5.23. The amino acid terminal sequence is KDEL, indicating that the protein is an endoplasmic heat shock protein. It was found that *Hsc70* gene from *S. frugiperda* shared a high homology with *Hsc70* genes from other species of Lepidoptera. *Hsc70* gene had the highest expression levels in the 2nd instar larvae and compound eyes of *S. frugiperda*. UV-A, temperature stresses of high and low induced obviously the *Hsc70* gene expression with increasing treatment time. Under UV-A, the expression levels of *Hsc70* gene in female and male adults reached the maximum at 120 min and 60 min, respectively. Under 36℃, the expression levels of *Hsc70* gene in female adults and male adults reached the peak at 120 min and 90 min, respectively. Under 4℃, the expression levels of *Hsc70* gene in both female and male adults were the highest at 30 min. The differential expression of *Hsc70* gene under UV-A radiation, temperature stress of high and low indicates that it plays a pertinent role in the molecular mechanism of *S. frugiperda* in response to environmental stress.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *Hsc70*; gene; cloning; expression analysis

草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*属鳞翅目夜蛾科，寄主广、迁飞力强，可为害多种农作物，给农业带来重大经济损失（李向永等，2019；徐蓬军等，2019；邓晓悦等，2020）。草地贪夜蛾对环境适应性强，在热带及亚热带可常年发生。2018年7月，草地贪夜蛾开始入侵亚洲的也门与印度，2019年由缅甸入侵我国云南省并大规模向北扩散为害（杨学礼等，2019；杨普云和常雪艳，2019；姜玉英等，2020）。在春、夏季时，随着气温的升高草地贪夜蛾向北迁移，当秋季时，随着光照日逐渐缩短且温度逐渐降低，草地贪夜蛾又回迁（江幸福等，2019）。草地贪夜蛾在大范围的迁飞定居过程中需要面对各种环境的胁迫。不良的环境胁迫因子会对昆虫的生存与繁殖产生威胁，如气温高时，昆虫会出现蛹羽化率低和寿命短等现象（全玉东等，2015；尹园园等，2019）；气温低时，昆虫的存活率较低（赵静等，2014）。为了减少不良环境造成的损伤，昆虫能够通过改变虫体结构和物质能量代谢以适应环境胁迫。大量研究表明，昆虫响应环境胁迫的机制与体内特殊的生理生化物质密切相关，如热激蛋白、海藻糖、抗氧化酶等小分子保护剂（吉青战等，2013；史彩华等，2016），但关于草地贪夜响应环境胁迫的机制尚不清楚。

外界胁迫被分为生物因素与非生物因素，前者包括病毒、细菌、生长因子等；后者主要有机械损伤、CO_2浓度、紫外（ultraviolet，UV）辐射、高温和低温等。热激蛋白（heat shock protein，Hsp）是机体为响应环境胁迫而产生的一类重要的分子伴侣蛋白，直接参与细胞内蛋白质从初始链的聚合到多亚基复合体层叠、组装等多个生物过程（Benjamin & McMillan，1998；Kim et al.，1998；秦佳等，2007）。根据分子量不同，昆虫热激蛋白被分成四大家族即Hsp90、Hsp70、Hsp60和sHsp（Sørensen et al.，2003），其它生物中还有Hsp100家族（Schirmer et al.，1996；Seyffer et al.，2012；刘聪聪等，2019）。Hsp70家族保守且成员众多，其主要生物学功能是参与由环境胁迫而引起刺激信号转导、氧化应答、抗冻、热休克和金属结合等过程，在不良环境下昆虫体内的热激蛋白通过稳定细胞结构或消解错误蛋白来维持正常生命活动，提高生物细胞对应激源的耐受力，阻止细胞凋亡（Anderson et al.，1994；Timperio et al.，2009）。根据表达特性不同，Hsp70家族被分为组成型Hsc70、诱导型Hsp70和中间型Hsc70三类（Piano et al.，2005）。一般情况下外界胁迫刺激不能诱导组成型Hsc70表达，但能使诱导型Hsp70和中间型Hsc70表达升高，随着胁迫消除其表达又逐渐恢复正常（胡志凤等，2017）。但Kim et al.（2008）和Wang et al.（2015）研究结果表明组成型Hsc70也能被诱导。

Hsc70蛋白具有调控生物发育的功能，并响应外界环境胁迫。Hsc70参与了中华蜜蜂*Apis cerana cerana*、大螟*Sesamia inferens*、黏虫*Mythimna separata*个体的生长发育，随着自身活动的增多，*Hsc70*基因表达呈波动变化（孙猛等，2014；徐凯等，2017；李鸿波等，2018）。在正常条件下，机体内Hsc70蛋白处于稳定状态，当机体受到外界胁迫后，其体内*Hsc70*基因表达量上调，以帮助机体恢复或清除错误组成的蛋白构象，维持细胞内蛋白质的平衡，进而对生物体进行保护（严伟倩等，2012；马骏等，2018）。如对拟南芥*Arabidopsis thaliana*进行热处理后，其体内*Hsc70*基因过表达，表明植株对热休克的耐受性增强（Sung & Guy，2003）；水稻经镉胁迫

处理后，其体内蛋白质磷酸化水平下降，*Hsc70*基因表达上调，进而抑制镉污染植株（Reddy & Prasad，1995）；当近江杜蛎*Crassostrea hongkongensis*受到外部化学或物理压力时，其体内*ChHsc70*基因启动子表达明显增强（Liu et al.，2018）；小菜蛾*Plutella xylostella*暴露于高温后，其体内*Hsc70*基因表达量上调以短暂保护虫体（Sonoda et al.，2006）；在冷驯化过程中，水稻二化螟*Chilo suppressalis*体内*Hsc70*基因表达略有下降（Sonoda et al.，2010），表明耐寒性与*Hsc70*基因表达相关；棉铃虫*Helicoverpa armigera*通过增加体内*Hsc70*表达量来响应UV胁迫（张长禹，2010）。

为进一步了解草地贪夜蛾响应环境胁迫的分子机制，本研究采用逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）技术克隆草地贪夜蛾热激蛋白*Hsc70*基因，并利用生物信息学分析其序列，采用实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）技术检测草地贪夜蛾*Hsc70*基因在不同龄期和成虫不同组织中的表达情况，分析UV-A、高、低温胁迫下的草地贪夜蛾*Hsc70*基因差异表达，以期为进一步探索昆虫响应环境胁迫的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和植物：2019年7月于贵州省普定县化处镇化新村采集草地贪夜蛾幼虫和成虫，带回实验室，于贵州大学昆虫研究所温度27±1℃、相对湿度（70±5）%、光周期14 L∶10 D的人工气候箱中用苗期玉米嫩叶饲养6代以上。玉米品种为杂交种郑单958，种子由河南预研种子科技有限公司提供，培养到苗期后采集嫩叶用于饲喂草地贪夜蛾。

LB（Luria-Bertani）培养基：胰蛋白胨0.5 g、酵母粉0.25 g、氯化钠晶体0.5 g、ddH_2O 50 mL。

试剂和仪器：Eastep Super RNA提取试剂盒，上海普洛麦格生物产品有限公司；HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒，北京康为世纪生物科技有限公司；PCR试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；pMD19-T Vector试剂盒、大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α感受态细胞、TB Green Premix DimerEraser荧光试剂盒，宝生物工程（大连）有限公司；其它试剂均为国产分析纯。RXZ型智能人工气候箱，宁波江南仪器厂；58B-01型UV-A紫外灯（波长320~400 nm，强度300 μW/cm^2），南京华强电子有限公司；UV-A紫外辐照计，北京师范大学光电仪器厂；−80℃超低温冰箱、NanoPhotometer™ P-Class超微量紫外分光光度仪，美国赛默飞世尔科技公司；BCD-221TMBA冷冻冷藏箱，海尔集团公司；T100 Thermal Cycler PCR仪、CFX96 Touch荧光定量PCR仪、Imaging System PowerPac系列电泳仪，美国Bio-Rad公司；HZ-2111K-B摇床，太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集和胁迫试验

不同发育阶段样品采集：随机选取草地贪夜蛾卵50粒、1龄幼虫30头、2龄幼虫15头、3~6龄幼虫各8头、蛹8头、雄成虫8头、雌成虫8头，重复3次。不同组织样品采集：选取雌、雄成虫头（无触角和复眼）、胸、腹、复眼、触角、翅、中肠、精巢/卵巢和足9个组织，每个组织取样8头，重复3次。

UV-A胁迫试验：取羽化24 h草地贪夜蛾雌、雄成虫各150头，在气候箱黑夜条件下暗适应2 h后将虫放进暗箱中，用灯管进行UV-A光照射，处理时间分别为0（CK）、30、60、90、120和150 min，每个处理取8头，重复3次。高、低温胁迫试验：取3日龄雌、雄成虫各300头，置于36℃和4℃条件下，处理时间分别为0（CK）、30、60、90、120和150 min，每个处理取8头，重复3次，试验期间温度为27±1℃、相对湿度为（70±5）%。所有样品处理后立即装入1.5 mL EP管中，置于含液氮的泡沫箱中，放入超低温冰箱中储存，备用。

1.2.2 草地贪夜蛾*Hsc70*基因克隆

按照Eastep Super RNA提取试剂盒说明书提取1.2.1样品总RNA，使用1.0%琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度仪检测RNA质量、纯度及浓度。以高质量总RNA为模板，按照HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒说明书合成cDNA第一链，反转录产物置于4℃冰箱中，备用。

通过比对已知同源昆虫斜纹夜蛾*S. litura*、棉铃虫、甜菜夜蛾*S. exigua*的*Hsc70*基因序列，在保守区采用Rrimer 6.0软件设计引物*SfHsc70*-F（5′-TCGAAGGTGAAGGAACAGCG-3′）/*SfHsc70-R*（5′-AGGTAAGCCTCAGCGGTTTC-3′），以合成的cDNA第一链为模板扩增草地贪夜蛾*Hsc70*基因中间片段，引物委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系：*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL、ddH_2O 8 μL、500 ng/μL cDNA模板1.5 μL、*SfHsc70*-F/*SfHsc70*-R引物各1.5 μL。PCR扩增反应程序：

95℃预变性3 min；95℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸1 min，共34个循环；72℃再延伸10 min。反应结束后取5 μL PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。按照凝胶回收试剂盒说明书对剩余扩增产物初步纯化，并将纯化PCR产物连接到pMD19-T载体上，转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞，放入LB培养基中，于37℃、转速为170 r/min条件下培养12 h，筛选出单一菌落且PCR检测后委托生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

根据已获得的草地贪夜蛾*Hsc70*基因中间片段序列，设计引物*SfHsc70*-F1（5′-CGAAGGTGAAGGAACAGCGT-3′）/*SfHsc70*-R3（5′-GATGTAACGAGACTCGCACC-3′），并委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。以cDNA第一链为模板扩增草地贪夜蛾编码区序列。25 μL PCR反应体系：*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL、ddH_2O 8 μL、500 ng/μL cDNA模板1.5 μL、*SfHsc70*-F1/*SfHsc70*-R3引物各1.5 μL。PCR扩增反应程序、纯化回收、连接转化测序均同中间片段扩增方法。最后利用DNAMAN 5.0软件对获得的各序列片段进行拼接。

1.2.3 草地贪夜蛾*Hsc70*基因生物信息学分析

使用ORF Finder软件（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）查找草地贪夜蛾*Hsc*70基因开放阅读框；使用ExPASy分析工具包（https://web.expasy.org/protparam/）进行翻译、评估pI和BLAST比对分析（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）氨基酸序列；应用软件MEGA 6.0采用邻接法构建草地贪夜蛾*Hsc*70基因的系统进化树，Bootstrap检验设置1 000次重复。

1.2.4 逆境胁迫下草地贪夜蛾*Hsc70*基因的表达分析

以草地贪夜蛾*β-Actin*基因为内参基因设计引物*qActin*-F(5′-GAAGCCAGGTAAAGTGGTGCT-3′)/*qActin*-R（5′-GTGTCCGTAGGGCTTGTCTG-3′）和*SfHsc70q*-F（5′-CTCCTGCACCTCGTGGTATC-3′）/*SfHsc70q*-R(5′-TGTCTTCGTCAGCGAACCTC-3′)，按照TB Green Premix DimerEraser荧光试剂盒说明书进行RT-qPCR。引物委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。20 μL RT-qPCR反应体系：TB Green Premix Ex *Taq* I 10 μL、ddH_2O 7 μL、*SfHsc70q*-F/*SfHsc70q*-R引物各1 μL、100 ng/μL cDNA模板1 μL。RT-qPCR反应程序：95℃预变性30 s；95℃变性5 s，56℃退火30 s，72℃延伸30 s，39个循环；65℃延伸5 s。每个处理设3次生物学重复和3次技术重复。根据所得数据采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算草地贪夜蛾*Hsc*70基因的相对表达量（Livak & Schmittgen，2001）。在不同发育阶段中以该基因在雌成虫中表达量为基准进行比较，在不同组织中以该基因在胸部的表达量为基准进行比较，不同胁迫处理中均以0 min表达量为基准进行比较。

1.3 数据分析

采用Excel 2016和SPSS 21.0对试验数据进行统计分析，应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾*Hsc70*基因克隆及生物信息学分析

克隆获得草地贪夜蛾*Hsc*70基因（GenBank登录号：MT130717），开放阅读框序列长为1 980 bp，共编码659个氨基酸，蛋白质相对分子量为73.12 kD，等电点为5.23，分子式为$C_{3224}H_{5189}N_{883}O_{1020}S_{15}$。含有带正负电荷的氨基酸残基92 110个。氨基酸序列的潜在磷酸化位点共有49个（图1）。草地贪夜蛾Hsc70氨基酸末端序列为KDEL，属于内质网热激蛋白。该氨基酸序列具有3个家族标签序列，即IDLGTTYS（第36~43位残基）、DLGGGTFDVSLL（第224~237位残基）和IVLVGGSTRIPKVQQ（第361~375位残基），属于热激蛋白Hsc70家族。

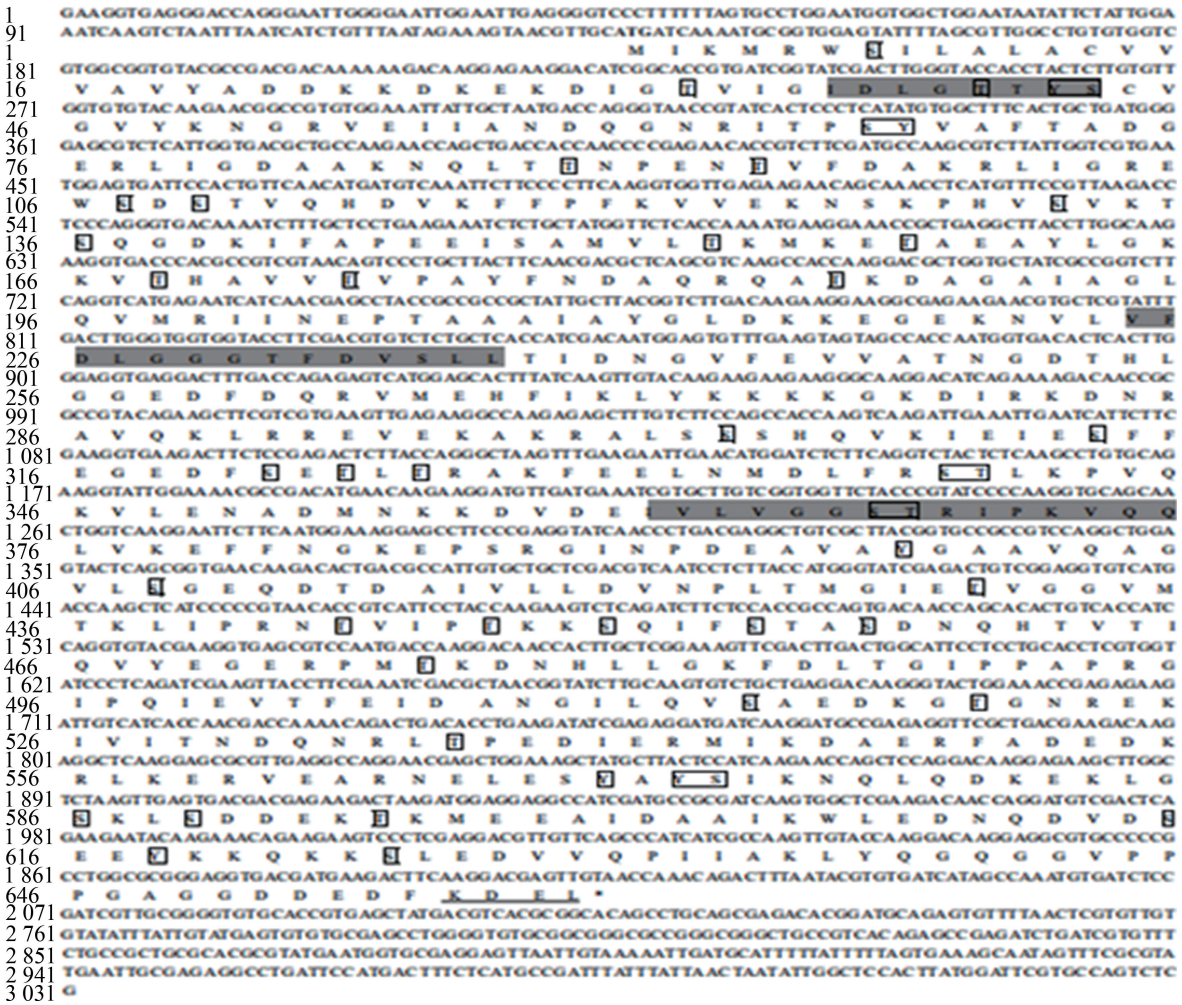
2.2 草地贪夜蛾Hsc70的系统发育树

BLAST序列相似性比较结果显示，草地贪夜蛾Hsc70与斜纹夜蛾Hsc70的氨基酸序列（GenBank登录号：XP_ 022827224.1）一致性达到99.39%。系统发育树显示，昆虫纲与脊椎动物各聚为一支，鞘翅目、半翅目和鳞翅目分别聚为一支，草地贪夜蛾Hsc70氨基酸序列与斜纹夜蛾Hsc70氨基酸序列聚为一支，置信度达98%，且与半翅目中烟蚜*Myzus persicae*互为姐妹群（图2）。

2.3 草地贪夜蛾*Hsc70*基因的表达分析

2.3.1 不同发育阶段和组织中*Hsc70*基因的表达

*Hsc70*基因在草地贪夜蛾整个发育阶段均有表达，其中在2龄幼虫期的相对表达量最高，是雌成虫中相对表达量的44.57倍，在3龄幼虫期的相对表达量次之，在4~6龄幼虫期相对表达量稳定，在1龄幼虫期、蛹期、雌成虫中的相对表达量较低（图3）。草地贪夜蛾*Hsc70*基因在不同组织中均有表达，其中在复眼和触角中的相对表达量显著均高于在其它组织中的相对表达量（P<0.05，图4）。



黑色加粗：起始密码子ATG；*：终止密码子TAA；方框：磷酸化位点；阴影部分：Hsc70家族签名序列；单下划线：C-端基序。Black bold text：the initial codon ATG；*：the termination codon TAA；box：the phosphorylation sites；the shadows part：signature motifs；single underline：C-terminal motif.

图1　草地贪夜蛾Hsc70的核苷酸序列及氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hsc70 from *Spodoptera frugiperda*

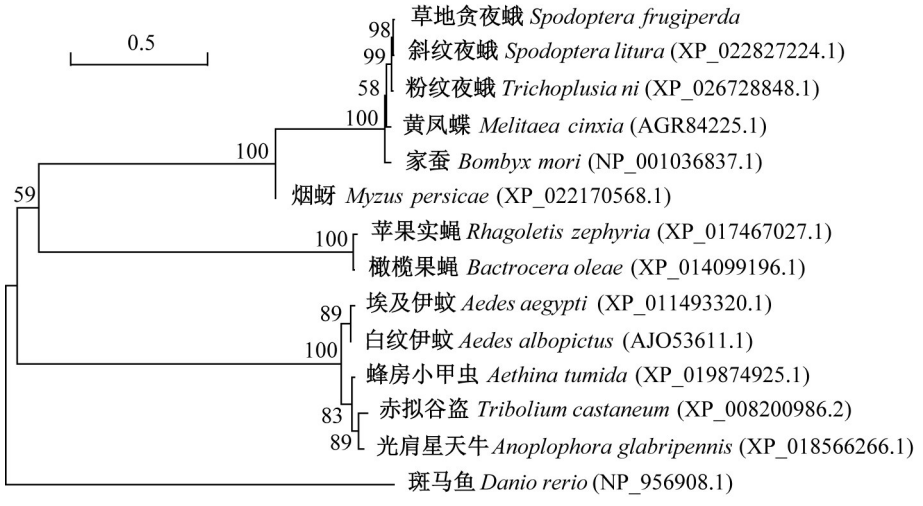


图2　基于Hsc70氨基酸序列采用邻接法构建草地贪夜蛾与其它昆虫的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of *Spodoptera frugiperda* and other insects based on the amino acid sequences of Hsc70 by neighbor joining method

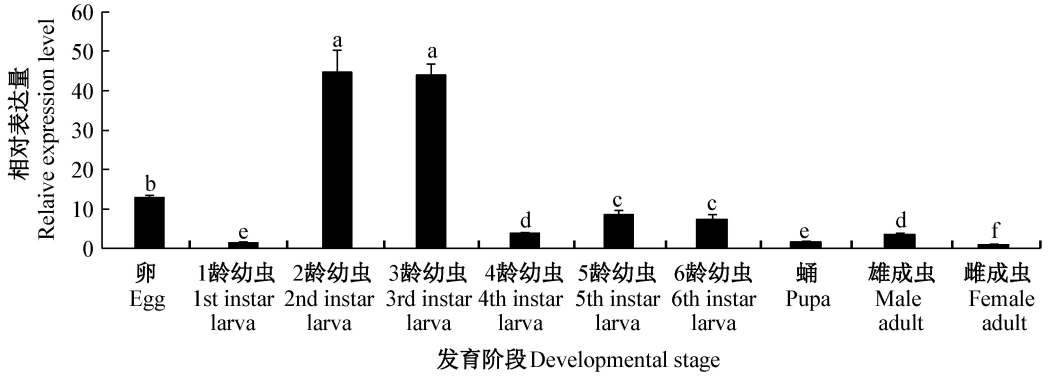


图3 不同发育时期草地贪夜蛾*Hsc70*基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of *Hsc70* gene of *Spodoptera frugiperda* at different developmental stages

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

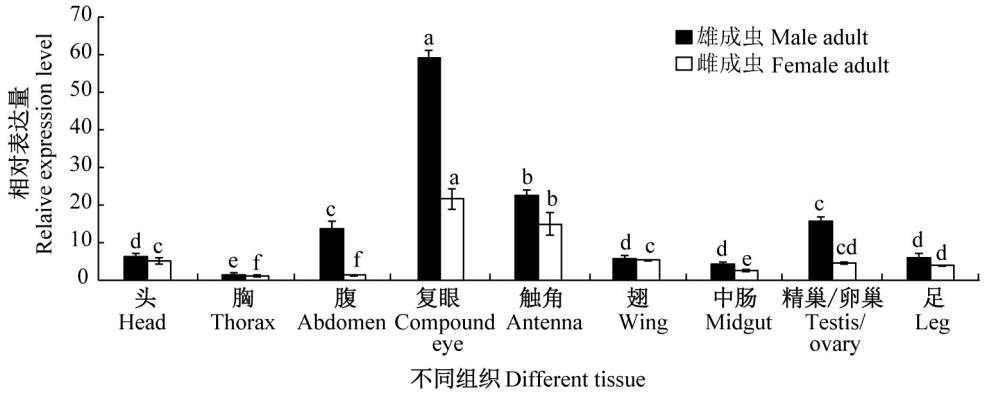


图4 草地贪夜蛾成虫不同组织*Hsc70*基因的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression level of *Hsc70* in different tissues of *Spodoptera frugiperda* adults

图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase letters on the same color bar indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.2 UV-A胁迫下草地贪夜蛾*Hsc70*基因的表达

在UV-A胁迫下，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因出现差异表达。随着时间延长，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因的相对表达量整体呈先升高后下降的趋势。草地贪夜蛾雄、雌成虫*Hsc70*基因相对表达量分别于60 min和120 min达到峰值，且与0 min时的*Hsc70*基因相对表达量差异显著（$P<0.05$），分别是0 min的2.65倍和8.28倍。当照射时间延长至90 min时，草地贪夜蛾雄成虫*Hsc70*基因的相对表达量降低到0 min的水平（图5-A）。

2.3.3 36℃、4℃胁迫下草地贪夜蛾*Hsc70*基因的表达

36℃胁迫能诱导草地贪夜蛾*Hsc70*基因的表达。草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因的相对表达量随着处理时间的延长均呈先上升后下降的趋势。草地贪夜蛾雄、雌成虫分别在90 min时和120 min达到峰值，分别是0 min时的27.30倍和6.74倍（图5-B）。

4℃胁迫下草地贪夜蛾*Hsc70*基因均有表达。草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因的相对表达量均在30 min达到峰值，分别是0 min的6.36倍和3.35倍。处理60 min时，草地贪夜蛾雄成虫*Hsc70*基因的相对表达量开始下降，直至150 min时*Hsc70*基因的相对表达量始终显著高于0 min的水平（$P<0.05$）。处理60 min时，草地贪夜蛾雌成虫*Hsc70*基因的相对表达量下降到0 min的水平，当处理时间延长至90、120和150 min时，*Hsc70*基因的相对表达量又显著高于0 min的水平（$P<0.05$，图5-C）。

3 讨论

本研究克隆得到草地贪夜蛾*Hsc70*基因的cDNA序列，开放阅读框为1 980 bp，共编码659个氨基酸；该氨基酸末端序列存在内质网定位信号且含有

Hsc70家族的3个典型特征序列，草地贪夜蛾Hsc70与其它鳞翅目夜蛾科昆虫Hsc70聚在一起，说明草地贪夜蛾*Hsc70*基因序列保守性强且为Hsc70家族成员，与关于大螟（孙猛等，2014）、地中海玉米螟*Sesamia nonagrioides*（Gkouvitsas et al.，2009）和二化螟（崔亚东等，2010）等的*Hsc70*基因的研究结果一致。

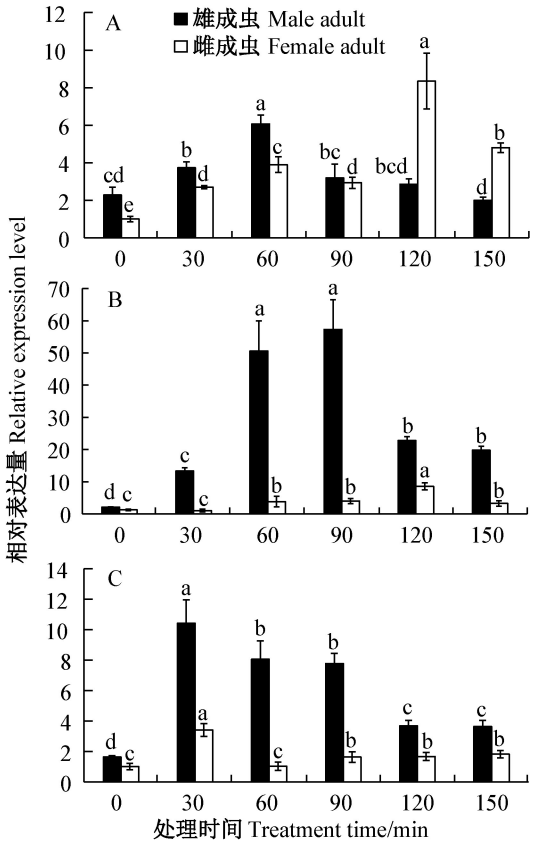


图5　UV-A（A）、36℃（B）和4℃（C）胁迫下草地贪夜蛾成虫*Hsc70*基因的相对表达量

Fig. 5　Relative expression levels of *Hsc70* in *Spodoptera frugiperda* adults exposed to UV-A (A), 36℃ (B) and 4℃ (C)

图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase letters on the same color bar indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

作为热激蛋白家族中的重要成员，Hsc70蛋白普遍存在于真核生物细胞中，调控生物生长发育过程（Boutet et al.，2003；Geneviève & Tanguay，2003）。本研究结果显示，草地贪夜蛾2龄和3龄幼虫期*Hsc70*基因表达量较其它发育阶段高，可能其在草地贪夜蛾低龄幼虫的生长发育过程中起着重要作用，与孙猛等（2014）关于大螟的研究结果一致。但*Hsc70*基因表达量在不同昆虫生长发育过程中起的作用不同，如美洲斑潜蝇*Liriomyza sativa*、斜纹夜蛾和西花蓟马*Frankliniella occidentalis*的*Hsc70*基因表达量在成虫期最高（Shu et al.，2011；李鸿波，2013）。*Hsc70*基因在昆虫组织中的表达具有特异性。草地贪夜蛾雌、雄成虫不同组织中*Hsc70*基因均有表达，表明其参与机体组织结构的发展，与Karouna-Renier et al.（2003）研究结果一致。草地贪夜蛾复眼和触角中*Hsc70*基因的相对表达量高于其它组织，这可能是因为复眼和触角是感受外界环境刺激的主要接受器官，需要大量*Hsc70*协助细胞转运化学信号（魏国树等，2002）。李鸿波等（2018）研究结果也表明黏虫*Hsc70*基因在触角中表达量较高。

生物所栖息的环境条件伴随着全球气候的频繁变化而变化，当变化超过生物能承受的范围便会对其产生胁迫反应。在环境胁迫诱导下，大量Hsc70与变性蛋白、转录因子结合，形成无活性的复合物，复合物再与原件序列结合，结合体进一步被激酶磷酸化，启动*Hsc70*基因表达（Kroeger et al.，1993）。当*Hsc70*基因表达量累积太多超过阈值后，*Hsc70*基因表达反而被抑制，机体中*Hsc70*基因表达逐渐下降至诱导前水平（Iwama et al.，1998）。本研究发现UV-A、36℃和4℃胁迫均能诱导草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因的表达，且表达呈先增高后降低的趋势，说明*Hsc70*基因参与了草地贪夜蛾对UV-A、36℃和4℃胁迫的响应，在昆虫适应环境胁迫分子机制中发挥着重要作用（Kiang & Tsokos，1998）。本研究结果还显示，受到UV-A胁迫后，草地贪夜蛾雄成虫*Hsc70*基因表达量在60 min时达到最高，雌成虫在120 min时达到最高，这可能是因为受到UV-A胁迫后，为了减少UV-A带来的细胞损伤，维持细胞内稳态，草地贪夜蛾体内*Hsc70*基因在短时间内显著表达，进而提高对胁迫的耐受性。羽摇蚊*Chironomus riparius*经UV照射后，其体内*CrHsc70*基因表达量也明显上调（Martín-Folgar et al.，2017）。本研究结果显示，随着UV-A照射时间的延长，草地贪夜蛾雌、雄成虫*Hsc70*基因均显著下降，可能因为是短时间的环境胁迫能导致*Hsc70*基因表达水平上调，但随着时间的延长，当胁迫对机体的损伤超出*Hsc70*基因的阈值时，其表达量便下降（Didomenico et al.，1982）。本研究结果显示，在36℃胁迫下，草地贪夜蛾雄、雄成虫*Hsc70*基因表达量分别在90 min

和120 min时达到峰值，在4℃胁迫下，雌、雄成虫*Hsc70*基因表达量均在30 min时达到峰值，表明*Hsc70*基因可能参与了虫体提高耐热性及抗寒调节过程。在温度胁迫下，麦红吸浆虫*Sitodiplosis mosellana*（Cheng et al.，2016）、亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*（胡志凤等，2017）等昆虫体内*Hsc70*基因表达量也呈先增加后下降的趋势。

草地贪夜蛾是新入侵我国的一种危险性害虫。本研究检测了*Hsc70*基因在UV-A辐射、高温和低温胁迫下的差异表达，分析了其在草地贪夜蛾响应环境胁迫中的作用。然而，关于其基因功能需要进一步验证。此外，本研究仅从基因水平进行了探索，下一步还需从蛋白质水平深入研究Hsc70蛋白的功能。

参 考 文 献（References）

ANDERSON JV, LI QB, HASKELL DW, GUY CL. 1994. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. Plant Physiology, 104(4): 1359−1370

BENJAMIN IJ, MCMILLAN DR. 1998. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones incardiovascular biology and disease. Circulation Research, 83(2): 117−132

BOUTET I, TANGUY A, ROUSSEAU S, AUFFRET M, MORAGA D. 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell Stress & Chaperones, 8 (1): 76−85

CHENG WN, LI D, WANG Y, LIU Y, ZHU- SALZMAN K. 2016. Cloning of heat shock protein genes (*hsp70*, *hsc70* and *hsp90*) and their expression in response to larval diapause and thermal stress in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*. Journal of Insect Physiology, 95: 66−77

CUI YD, LU MX, DU YZ. 2010. Cloning of the heat shock protein 70 gene from *Chilo suppressalis* and the analysis of its expression characteristics under heat stress. Acta Entomologica Sinica, 53 (8): 841−848 (in Chinese) [崔亚东, 陆明星, 杜予州. 2010. 二化螟热休克蛋白70基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报, 53(8): 841−848]

DENG XY, ZHANG XY, JIANG CX, ZHANG Y, LI Q, WANG RL, FENG CH, MA L, WAN XW, TIAN H. 2020. Source analysis of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) invaded Western Sichuan Plateau. Plant Protection, 46(2): 78−84 (in Chinese) [邓晓悦, 张雪艳, 蒋春先, 张悦, 李庆, 王茹琳, 封传红, 马利, 万宣伍, 田卉. 2020. 入侵川西高原的草地贪夜蛾虫源分析. 植物保护, 46(2): 78−84]

DIDOMENICO BJ, BUGAISKY GE, LINDQUIST S. 1982. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. Cell, 31(3 Pt2): 593−603

GENEVIÈVE M, TANGUAY RM. 2003. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 14(5): 291−299

GKOUVITSAS T, KONTOGIANNATOS D, KOURTI A. 2009. Cognate *Hsp70* gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. Insect Molecular Biology, 18(2): 253−264

HU ZF, XING Y, ZHANG TS, DONG H, CONG B. 2017. Expression analysis of heat shock protein gene (HSPs) of *Ostrinia furnacalis* (Guenée) under alternating temperature stress. Journal of Shenyang Agricultural University, 48(2): 213−218 (in Chinese) [胡志凤, 邢玥, 张统书, 董辉, 丛斌. 2017. 亚洲玉米螟交变温度下热休克蛋白基因(HSPs)的表达分析. 沈阳农业大学学报, 48(2): 213−218]

IWAMA GK, THOMAS PT, FORSYTH RB, VIJAYAN MM. 1998. Heat-shockprotein expression in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 8: 35−36

JI QZ, WANG HO, LEI ZR, ZHANG KW, WANG J, ZHANG Y. 2013. Cloning and expression of heat shock protein 90 gene in relation to heat stress in the leafminer, *Liriomyza trifolii*. Plant Protection, 39(5): 110−116, 122 (in Chinese) [吉青战, 王海鸿, 雷仲仁, 张靠稳, 王娇, 张烨. 2013. 三叶斑潜蝇热激蛋白Hsp90基因的克隆及其在高温胁迫下的表达分析. 植物保护, 39(5): 110−116, 122]

JIANG XF, ZHANG L, CHENG YX, SONG LL. 2019. Advances in migration and monitoring techniques of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Plant Protection, 45(1): 12−18 (in Chinese) [江幸福, 张蕾, 程云霞, 宋琳琳. 2019. 草地贪夜蛾迁飞行为与监测技术研究进展. 植物保护, 45(1): 12−18]

JIANG YY, LIU J, YANG JJ, ZHAO WX, YIN L, LIU Y, YE SF, QIN BQ, SONG LD. 2020. Trapping effect of searchlight-trap and light trap for the moth of *Spodoptera frugiperda* in 2019. Plant Protection, 46(3): 118−122, 156 (in Chinese) [姜玉英, 刘杰, 杨俊杰, 赵文新, 尹丽, 刘媛, 叶少锋, 覃宝勤, 宋梁栋. 2020. 2019年草地贪夜蛾灯诱监测应用效果. 植物保护, 46(3): 118−122, 156]

KAROUNA-RENIER NK, YANG WJ, RAO KR. 2003. Cloning and characterization of a 70 kDa heat shock cognate gene (HSC70) from two species of *Chironomus*. Insect Molecular Biology, 12 (1): 19−26

KIANG JG, TSOKOS GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacology & Therapeutics, 80(2): 183−201

KIM DH, LEE SC, KWAK DY, LEE KY. 2008. Cloning of heat shock protein genes from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, and the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, and their expression in relation to thermal stress. Insect Science, 15 (5): 415−422

KIM KK, KIM R, KIM SH. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. Nature, 394(6693): 595−599

KROEGER PE, SARGE KD, MORIMOTO RI. 1993. Mouse heat

shocktranscription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. Molecular and Cellular Biology, 13(6): 3370−3383

LI HB. 2013. Response to thermal stress in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. Ph. D Thesis. Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese) [李鸿波. 2013. 入侵害虫西花蓟马对温度胁迫的响应. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学]

LI HB, DAI CG, ZHANG CR, HE YF. 2018. Cloning of hsc70 and its expression in response to crowding in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). Entomological Knowledge, 55(5): 825−833 (in Chinese) [李鸿波, 戴长庚, 张昌容, 何永福. 2018. 粘虫hsc70克隆及其密度胁迫下的表达模式. 应用昆虫学报, 55(5): 825−833]

LI XY, YIN YQ, WU K, KHIN TN, KHIN NC, ZHAO XQ, CHEN AD. 2019. Investigation report of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) occurrence in Myanmar in 2019. Plant Protection, 45(4): 69−73 (in Chinese) [李向永, 尹艳琼, 吴阔, KHIN TN, KHIN NC, 赵雪晴, 谌爱东. 2019. 2019年缅甸草地贪夜蛾发生情况考察报告. 植物保护, 45(4): 69−73]

LIU CC, ZHANG Z, GUAN XL, PEI X, ZHENG J. 2019. Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene in *Sorbus pohuashanensis*. Molecular Plant Breeding, 17(19): 6276−6286 (in Chinese) [刘聪聪, 张泽, 关雪莲, 裴鑫, 郑健. 2019. 花楸树热激蛋白70基因的克隆及表达分析. 分子植物育种, 17(19): 6276−6286]

LIU HR, XU DL, CUI M, HOU TL, ZHANG QZ. 2018. The transcriptional factor YB-1 positively regulates Hsc70 transcription in *Crassostrea hongkongensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 495(4): 2404−2409

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402−408

MA J, YU PH, WANG SJ, WANG ZM, WANG YC, WANG Q, WANG B. 2018. Effect of electroacupuncture on expression of Lamp2a, Hsc70 and α-syn in *Substantia nigra* of Parkinson's disease model rats induced by rotenone. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 36(4): 859−862 (in Chinese) [马骏, 余沛豪, 王述菊, 王中明, 王彦春, 王琪, 王彬. 2018. 电针对帕金森病模型大鼠脑黑质内Lamp2a、Hsc70、α-syn表达的影响. 中华中医药学刊, 36(4): 859−862]

MARTÍN-FOLGAR R, AQUILINO M, OZÁEZ I, MARTÍNEZ-GUITARTE J. 2017. Ultraviolet filters and heat shock proteins: effects in *Chironomus riparius* by benzophenone-3 and 4-methylbenzylidene camphor. Environmental Science and Pollution Research, 25: 333−344

PIANO A, FRANZELLITTI S, TINTI F, FABBRI E. 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Gene, 361: 119−126

QIN J, YANG JY, YI SY, LIU J. 2007. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis. Chinese Bulletin of Life Sciences, 19(2): 159−163 (in Chinese) [秦佳, 杨金莹, 伊淑莹, 刘箭. 2007. 热激蛋白对细胞凋亡的调节作用. 生命科学, 19(2): 159−163]

QUAN YD, HE KL, WANG ZY, WEI HY. 2015. Effects of transient exposure to extremely high temperatures on egg, neonate and adult of *Ostrinia furnacalis*. Journal of Plant Protection, 42(6): 985−990 (in Chinese) [全玉东, 何康来, 王振营, 魏洪义. 2015. 短时极端高温对亚洲玉米螟卵、初孵幼虫和成虫的影响. 植物保护学报, 42(6): 985−990]

REDDY GN, PRASAD MNV. 1995. Cadmium-induced protein phosphorylation changes in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Journal of Plant Physiology, 145(1/2): 67−70

SCHIRMER EC, GLOVER JR, SINGER MA, LINDQUIST S. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. Trends in Biochemical Sciences, 21(8): 289−296

SEYFFER F, KUMMER E, OGUCHI Y, WINKLER J, KUMAR M, ZAHN R, SOURJIK V, BUKAU B, MOGK A. 2012. Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. Nature Structural & Molecular Biology, 19: 1347−1355

SHI CH, HU JR, LI CR, ZHANG YJ. 2016. Research progress in the cold tolerance mechanism of insects under environmental stress. Plant Protection, 42(6): 21−28 (in Chinese) [史彩华, 胡静荣, 李传仁, 张友军. 2016. 环境胁迫下昆虫的耐寒适应机制研究进展. 植物保护, 42(6): 21−28]

SHU YH, DU Y, WANG JW. 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 158(1): 102−110

SONODA S, ASHFAQ M, TSUMUKI H. 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (hsp90, hsc70, and hsp19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 62 (2): 80−90

SONODA S, FUKUMOTO K, IZUMI Y, YOSHIDA H, TSUMUKI H. 2010. Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 63(1): 36−47

SØRENSENG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Letters, 6(11): 1025−1037

SUN M, LU MX, TANG XT, DU YZ. 2014. Molecular cloning and expression profiling of *HSC70* gene in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Entomologica Sinica, 57(7): 787−797 (in Chinese) [孙猛, 陆明星, 汤小天, 杜予州. 2014. 大螟*HSC70*基因克隆及表达模式分析. 昆虫学报, 57(7): 787−797]

SUNG DY, GUY CL. 2003. Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70-1* in *Arabidopsis*: evidence for pleiotropic consequences. Plant Physiology, 132: 979−987

TIMPERIO AM, EGIDI MG, ZOLLA L. 2009. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics, 71(4): 391−411

WANG PF, XU P, ZENG S, ZHOU L, ZENG L, LI GF. 2015. Comparative analysis of sequence feature and expression of two heat shock cognate 70 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. Gene, 560: 226−236

WEI GS, ZHANG QW, ZHOU MZ, WU WG. 2002. Characteristic response of the compound eyes of *Helicoverpa armigera* to light. Acta Entomologica Sinica, 45(3): 323−328 (in Chinese) [魏国树, 张青文, 周明牂, 吴卫国. 2002. 棉铃虫蛾复眼光反应特性. 昆虫学报, 45(3): 323−328]

XU K, NIU QS, LIU YL, CHEN DH, YANG S, ZHAO HT, JIANG YS. 2017. Expression characteristics of *HSC70-4* gene in *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). Journal of Environmental Entomology, 39(1): 55−61 (in Chinese) [徐凯, 牛庆生, 刘玉玲, 陈东海, 杨爽, 赵慧婷, 姜玉锁. 2017. 中华蜜蜂*HSC70-4*基因表达特性的研究. 环境昆虫学报, 39(1): 55−61]

XU PJ, ZHANG DD, WANG J, WU KM, WANG XW, WANG XF, REN GW. 2019. The host preference of *Spodoptera frugiperda* on maize and tobacco. Plant Protection, 45(4): 61−64, 90 (in Chinese) [徐蓬军, 张丹丹, 王杰, 吴孔明, 王新伟, 王秀芳, 任广伟. 2019. 草地贪夜蛾对玉米和烟草的偏好性研究. 植物保护, 45(4): 61−64, 90]

YAN WQ, WANG JL, TANG BS. 2012. Functions of carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein and its role in neurodegenerative disease. Chinese Journal of Medical Genetics, 29(4): 426−430 (in Chinese) [严伟倩, 王俊岭, 唐北沙. 2012. 热休克同源蛋白70羧基端作用蛋白的功能及其与神经退行性疾病的关系. 中华医学遗传学杂志, 29(4): 426−430]

YANG PY, CHANG XY. 2019. The advance in strategies for prevention and control of *Spodoptera frugiperda* in Asia and Africa. China Plant Protection, 39(6): 88−90 (in Chinese) [杨普云, 常雪艳. 2019. 草地贪夜蛾在亚洲、非洲发生和影响及其防控策略. 中国植保导刊, 39(6): 88−90]

YANG XL, LIU YC, LUO MZ, LI Y, WANG WH, WAN F, JIANG H. 2019. The first discovery of *Spodoptera frugiperda* in Jiangcheng County, Yunnan Province. Yunnan Agriculture, (1): 72 (in Chinese) [杨学礼, 刘永昌, 罗茗钟, 李依, 王文辉, 万飞, 姜虹. 2019. 云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾. 云南农业, (1): 72]

YIN YY, ZHAI YF, LIN QC, YU Y, ZHENG L, CHEN H. 2019. Impacts of periodic heat events on the application of *Encarsia formosa*. Plant Protection, 45(3): 115−118, 124 (in Chinese) [尹园园, 翟一凡, 林清彩, 于毅, 郑礼, 陈浩. 2019. 周期性高温对丽蚜小蜂田间应用效果的影响. 植物保护, 45(3): 115−118, 124]

ZHANG CY. 2010. Study on the reproductive compensation of *Helicoverpa armigera* under UV stress and cloning and expresion of Hsps genes. Ph. D Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [张长禹. 2010. UV胁迫下棉铃虫生殖补偿研究及Hsps基因的克隆与表达. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]

ZHAO J, LI S, CHEN ZZ, WANG S, XU YY. 2014. Effects of cold stress on survival and activities of several enzymes in multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) adults. Journal of Plant Protection, 41(5): 513−518 (in Chinese) [赵静, 李姝, 陈珍珍, 王甦, 许永玉. 2014. 低温胁迫对异色瓢虫成虫存活及体内几种酶活力的影响. 植物保护学报, 41(5): 513−518]

（责任编辑：张俊芳）