

## 异色瓢虫 3 个小分子热激蛋白序列及低温诱导表达分析

汪慧娟<sup>1</sup>, 赵静<sup>2</sup>, 施佐堃<sup>1</sup>, 邱玲玉<sup>1</sup>, 王甦<sup>3</sup>, 张帆<sup>3</sup>, 王世贵<sup>1</sup>, 唐斌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036; <sup>2</sup>潍坊科技学院植物病虫害研究所, 山东潍坊 262700;

<sup>3</sup>北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

**摘要:**【目的】异色瓢虫 (*Harmonia axyridis*) 是一种重要的捕食性天敌昆虫, 广泛应用于农林害虫的生物防治中。本研究旨在分析探索低温胁迫条件对 3 个小分子热激蛋白 (small heat shock protein, sHSP) 抗寒基因相对表达量的影响, 为异色瓢虫低温冷藏及其抗寒机制研究提供科学依据。【方法】在转录组获得异色瓢虫基因序列的基础上, 根据特异性引物获得 *HaHSP47.74* (基因登录号: KX161871)、*HaHSP21.53* (基因登录号: KX161873) 和 *HaHSP21.52* (基因登录号: KX161874) 基因 cDNA 的开放阅读框序列 (open reading frame, ORF), 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 技术测定异色瓢虫 3 个 sHSP 基因在不同发育阶段、短时降温和短时降温后恢复处理、低温储存处理下以及不同色斑的表达水平。【结果】在不同发育阶段处理中, *HaHSP47.74* 和 *HaHSP21.53* 在蛹期及成虫期高表达; *HaHSP21.52* 在 4 龄幼虫第 4 天表达量显著高于对照组。在短时降温处理中, *HaHSP47.74* 在降温至 0℃ 和 -5℃ 时表达量显著高于对照组; *HaHSP21.53* 和 *HaHSP21.52* 在降温过程中表达量显著降低。在短时降温后恢复处理中, 3 个 sHSP 基因表达量无显著差异。在低温储藏条件下, 实验种群: 黑底雌瓢虫 *HaHSP47.74* 表达水平在储存第 5 天时显著升高, 黄底雌瓢虫 *HaHSP47.74* 在储存 5—15 d 时表达量显著升高; 黑底雌瓢虫 *HaHSP21.53* 在储存 5—20 d 时显著性高表达, 黄底雌瓢虫 *HaHSP21.53* 在 15 d 时显著性高表达; 黑底和黄底雌瓢虫 *HaHSP21.52* 无显著性高表达; 越冬种群: 黑底和黄底雌瓢虫 *HaHSP47.74*、*HaHSP21.53*、*HaHSP21.52* 在低温储存中均无显著性高表达。【结论】sHSP 在异色瓢虫发育阶段可能发挥着作用。短时降温胁迫能够诱导 sHSP 基因高表达。实验种群在低温储存条件下 *HaHSP47.74* 和 *HaHSP21.53* 均出现了显著性高表达, 表明这两个基因在瓢虫受到冷驯化时起到了作用。此外, 不同色斑型异色瓢虫的抗寒机制和抗寒能力有所差异。

**关键词:** 异色瓢虫; 小分子热激蛋白; 抗寒基因; 低温储存; 实时荧光定量 PCR; 基因表达

## Sequence Analysis and Induced Expression of Three Novel Small Heat Shock Proteins Mediating Cold-Hardiness in *Harmonia axyridis*

WANG HuiJuan<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>2</sup>, SHI ZuoKun<sup>1</sup>, QIU LingYu<sup>1</sup>, WANG Su<sup>3</sup>, ZHANG Fan<sup>3</sup>, WANG ShiGui<sup>1</sup>, TANG Bin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036; <sup>2</sup>Institute of Plant Diseases and Pests, Weifang University of Science and Technology, Weifang 262700, Shandong; <sup>3</sup>Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

**Abstract:** 【Objective】 *Harmonia axyridis* is an important predator insect, and it is widely used in agricultural and forestry production. In this study, three small heat shock proteins (sHSP) were screened out and cloned using high throughput sequencing techniques. Also the expression levels of these three sHSP (sHSPs/sHSP genes) were detected under cold stress in order to explore

收稿日期: 2017-03-06; 接受日期: 2017-04-17

基金项目: 国家重点研发计划 (SQ2017ZY060059)、国家桃产业技术体系 (nycytx-31-02)、北京市科技计划 (D171100001617003)、北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (20170107)、北京市农林科学院青年科研基金 (QNJJ201725)、潍坊市科技发展计划 (2016ZJ1113)

联系方式: 汪慧娟, E-mail: whjj\_701@163.com. 通信作者唐斌, Tel: 0571-28865680; E-mail: tbzm611@163.com

the improvement of *H. axyridis* cold resistance role under low temperature stress conditions. 【Method】 Based on *H. axyridis* gene sequences in the transcriptome, several specific primers were designed to obtain the full-length open reading frame (ORF) sequence of the three sHSP genes. The expression of these sHSP genes was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) under short-time cooling or short-time cooling recover conditions, and between the black and yellow females of experimental and overwintering populations under low-temperature storage. 【Result】 *HaHSP47.74* and *HaHSP21.53* were highly expressed at the pupal and adult stages during different developmental stages. And the expression of *HaHSP21.52* in 4th instar larvae on the 4th day was significantly higher than that in control group. In short-term cooling treatment, the expression of *HaHSP47.74* was significantly higher than that of the control group when the temperature was reduced to 0°C and -5°C. The expression of *HaHSP21.53* and *HaHSP21.52* decreased significantly during cooling. There was no significant difference in the expression of the three sHSP genes in short-term heating treatment. The *HaHSP47.74* expression of black female was significantly higher on the 5th day, while the yellow female was significantly higher from the 5th to 15th day in the experimental population under the condition of low temperature storage. The expression of *HaHSP21.53* in black females was significantly higher from the 5th day to 20th day, while in the yellow females was significantly higher on the 15th day. Moreover, there was no significant expression of *HaHSP21.52* in black or yellow female, and *HaHSP47.74*, *HaHSP21.53*, *HaHSP21.52* in black females and yellow females were not significantly higher in the low temperature storage treatment in overwintering population. 【Conclusion】 sHSP may play a role in developmental stages of *H. axyridis*. *HaHSP47.74* expression increased significantly under short-term cooling conditions, suggesting that sHSP in *H. axyridis* may play a key role under low temperature stress. While higher expression of *HaHSP47.74* and *HaHSP21.53* was found in the experimental population under low temperature storage, which indicated that these two genes played an important role in the cold acclimation. In addition, the expression level of black and yellow females of *H. axyridis* was different, it was speculated that the resistance and mechanism of different colors of *H. axyridis* are different.

**Key words:** *Harmonia axyridis*; small heat shock protein; cold-resistance gene; preservation in low temperature; qRT-PCR; gene expression

## 0 引言

【研究意义】异色瓢虫 (*Harmonia axyridis*) 属鞘翅目 (Coleoptera) 瓢虫科 (Coccinellidae), 对蚜虫、叶螨、介壳虫等重要害虫具有很强的捕食能力, 目前在农林生产实践中被广泛应用<sup>[1-2]</sup>。从分子水平探讨低温诱导对异色瓢虫抗寒基因表达水平的影响, 可揭示昆虫抗寒的机制。同时, 也可对异色瓢虫自然种群的越冬保护、人工繁殖种群的冷藏管理和在低温环境中的释放应用提供参考。【前人研究进展】温度在很大程度上影响着昆虫的生长发育、基本行为及进化途径<sup>[3]</sup>。昆虫在长期进化过程中形成了各种各样的抗寒策略<sup>[4]</sup>, 有的昆虫通过迁徙或躲藏等行为避开低温环境, 有的昆虫则会通过调节机体代谢, 积累抗寒物质来抵御寒冷<sup>[5-6]</sup>。自然界中, 异色瓢虫以成虫滞育越冬, 有关异色瓢虫抗寒性、越冬策略、季节性表型等研究已有大量报道<sup>[7-11]</sup>。热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 具有高度保守的氨基酸序列, 广泛存在于微生物及高等动植物中, 当生物体遭受高温、低温及其他不利的环境胁迫时, HSPs 对生物体的预防反应及稳定性起到重要作用<sup>[12]</sup>。根据分子量的大小, HSPs 可以分为 HSP100 家族、HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60

家族以及小分子热激蛋白 (small heat shock protein, sHSP) 家族<sup>[13]</sup>。sHSP 分子量一般在 15—50 kD, sHSP 具有分子伴侣的功能, 其能够使蛋白质处于有利于折叠的感受态, 并且与其他 HSPs 共同作用使蛋白质有效折叠。研究发现过量表达 sHSP 能增强细胞对热休克的耐受力<sup>[14]</sup>。sHSP 在对抗细胞凋亡以及生物体生长发育和分化过程中也发挥着重要作用<sup>[14]</sup>。此外, 不同色斑种群的比例呈现出季节性变化, 不同色斑种群异色瓢虫成虫的低温存活率可能有所差异<sup>[15]</sup>。【本研究切入点】有关 sHSP 和异色瓢虫抗寒性关系的研究还较少, 短时低温胁迫能明显提高异色瓢虫抗逆能力, sHSP 基因在这个过程中 mRNA 水平上的变化情况还有待探究。【拟解决的关键问题】通过检测 3 个 sHSP 基因在不同发育阶段、短时降温和短时降温后恢复处理、低温储存处理下以及不同色斑种群的表达水平, 分析其在异色瓢虫抗寒能力中所起的作用。

## 1 材料与方法

试验于 2015—2016 年在杭州师范大学完成。

### 1.1 试验昆虫

异色瓢虫实验种群: 2014 年 3 月底采集于杭州师范大学校园内。在温度 (25±1) °C、相对湿度为 (70±5)

%和光周期 16L : 8D 条件下, 在养虫笼 (60 目纱网, 0.5m×0.5m×0.5m) 内放入异色瓢虫集中饲养, 笼内放置带有足量豆蚜 (*Aphis curviness*) 的蚕豆苗, 待取食一段时间后更换一盆新的含足量蚜虫的蚕豆苗。折叠的纸条放入养虫笼内, 作为异色瓢虫产卵的基质。待雌虫产卵后, 将含有新鲜卵块的蚕豆苗叶或纸条放入塑料培养皿, 直至虫卵孵化后转移至养虫笼继续饲养, 繁殖 3 代后的异色瓢虫用于试验。异色瓢虫越冬种群: 2014 年 10 月初直接采于中国黑龙江省帽儿山。

## 1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器与设备 移液器 (德国 Eppendorf 公司)、冰箱 (海尔 BCD-290W)、-80℃冰箱 (艾本德 U410-86)、恒温水浴锅 (上海精宏 DK-8D)、无菌超净工作台 (ESCO)、台式高速离心机 (Sigma 1-14)、Eppendorf5424 型常温离心机 (德国 Eppendorf 公司)、电子分析天平 (梅特勒-托利多 AL204)、AG22331 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)、实时荧光定量 PCR 仪 (BioRAD CFX96)、电泳仪和电泳槽 (北京六一仪器厂)、DNP-9272 恒温培养箱 (上海精密实验设备公司)、NanoDrop™ 2000 微量测定分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司)、5T4100-1106 型紫外凝胶成像系统 (美国 Tanon 公司)、高压蒸汽灭菌锅 (SANYO MLS-3750)。

1.2.2 主要试剂与药品 DNA Marker DL2000、6×Loading buffer、cDNA 一链反转录试剂盒、T 载体等购自大连 TaKaRa 公司; RNA 抽提 Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; PCR 引物合成和测序由上海 Invitrogen 公司完成; 琼脂糖购自 Sigma 公司、实时荧光定量 PCR 试剂盒和八连管等均购自美国 Bio-RAD 公司; 质粒提取试剂盒及凝胶回收试剂盒购买于德国 Omega 公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇、EDTA 均购自杭州米克化工有限公司; DEPC 水、氨苄卡那霉素、蛋白胨、酵母粉、氯化钠、琼脂、甘油等常规试剂购自上海生工生物工程有限公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 抽提及一链 cDNA 合成 用 Trizol 法提取异色瓢虫整虫的总 RNA 后, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度及降解情况, 再用微量核酸测定仪测定 RNA 的浓度。在反转录反应中, 取 1 μg 总 RNA 作为模板, 根据反转录试剂盒说明书来完成试验。

1.3.2 sHSP 全长序列验证 从公司测序得到的异色瓢虫转录组数据库中, 找出与 HSP 基因相近的序列,

通过比对找出 3 条小分子热激蛋白序列。将这些基因序列翻译成蛋白序列并在 NCBI 库中进行比对, 发现这些序列包含完整的 cDNA 开放阅读框序列。根据已得的序列, 分别从两端设计特异性引物 (表 1), 进行 PCR 扩增。具体 PCR 条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 共 30 个循环, 72℃充分延伸 5 min。反应结束, 取 5 μL PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳。当检测到目的条带后, 将目的片段回收纯化, 再进行 T 克隆并连接到 T 载体中, 而后进行菌落 PCR 验证, 送往上海 Invitrogen 公司测序。

1.3.3 sHSP 基因引物设计 以 *Harp49* 为内参基因<sup>[16]</sup>。根据转录组测得的基因序列, 利用 DNASTAR 和 Primer 5.0 软件设计 *rp49* 及 3 个 sHSP 基因的特异性引物。

表 1 试验中所用引物

Table 1 Primers used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
Ha-rp49-QF	GCGATCGCTATGGAAAACCTC
Ha-rp49-QR	TACGATTTTGCATCAACAGT
HaHSP47.74-F	AGGTTCCTGCGATTTCAC
HaHSP47.74-R	ACATCTGGCATTGTGGTC
HaHSP21.53-F	CCTATCAAACCTGGGAGAC
HaHSP21.53-R	GATGTGGTGGTGTCTGGT
HaHSP21.52-F	CTCGCTGTTACCAATCCT
HaHSP21.52-R	GAACCTGTCCGTGCCATA

1.3.4 不同发育阶段异色瓢虫 sHSP 基因的表达 选取实验种群异色瓢虫作为试验材料。不同发育阶段包括第 1—4 天龄幼虫、预蛹期、第 1—3 天蛹期及第 1—3 天成虫期 (蜕皮或羽化 2 h 后)。根据异色瓢虫 sHSP 基因序列以及 *Harp49* 基因序列设计 qRT-PCR 特异性检测引物 (表 1)。每个处理随机抽取 3 头且每个处理组重复 3 次, 用紫外凝胶电泳检测 RNA 纯度, 用微量测定分光光度计测定 RNA 浓度, 取 1 μg 总 RNA 进行反转录反应。取 1 μL 反转录产物用于 qRT-PCR, 每个样品重复 3 次。具体荧光定量 PCR 程序: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 15 s, 59℃退火 30 s, 68℃延伸 30 s, 40 个循环, 在 68℃收集荧光信号<sup>[17]</sup>。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行数据分析<sup>[18]</sup>。

1.3.5 短时降温和短时降温后恢复处理条件下异色瓢虫 sHSP 基因的表达 选取成虫一周后的实验种群异色瓢虫作为试验材料。短时降温处理: 将异色瓢虫置于 25℃人工智能培养箱存放 2 h, 之后取出一批试验材料, 而后依次将人工智能培养箱温度设定为 15、

10、5、0 和 -5℃，每个温度梯度各存放 2 h 并取出试验材料。

短时降温后恢复处理：将异色瓢虫置于 -5℃ 人工智能培养箱存放 2 h，之后取出一批试验材料，而后依次将人工智能培养箱温度设定为 0、5、10、15 和 25℃，每个温度梯度各存放 2 h 并取出试验材料。重复上述试验 3 次，每个处理随机选取 3 头异色瓢虫。用电匀浆器充分研磨异色瓢虫，Trizol 法提取总 RNA，反转录出 cDNA 并参照 1.3.4 的方法进行 qRT-PCR，测定异色瓢虫 3 个 sHSP 基因的相对表达量，用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行数据分析。

**1.3.6 低温储存条件下实验种群和越冬种群异色瓢虫 sHSP 基因的表达** 在实验种群和越冬种群中分别选取黑底色斑雌性（简称黑雌）和黄底色斑雌性（简称黄雌）成虫一周后异色瓢虫作为实验昆虫，在 4℃ 冰箱中储存，分别在 0、5、10、15 和 20 d 取材，每个取材时间点随机选取 5—10 头异色瓢虫，试验重复 3 次。用电匀浆器充分研磨试验昆虫，Trizol 法提取总 RNA，反转录出 cDNA 并参照 1.3.4 的方法进行 qRT-PCR，测定异色瓢虫 3 个 sHSP 基因的相对表达量，用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行定量结果数据分析。

#### 1.4 序列分析及数据统计分析

应用 DNASTar 软件寻找目标基因序列开放阅读框并翻译成蛋白质，等电点及分子量在线分析网址：[http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)，使用 SPSS statistics 20 对结果进行比较分析，不同处理组间采用单因素方差分析（One-way ANOVA），多重比较采用 Tukey-Kramer HSD 分析。图 1—5 中不同小写及大写字母表示经单因素方差分析，Tukey-Kramer HSD 检验后存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

## 2 结果

### 2.1 异色瓢虫转录组测序数据的筛选

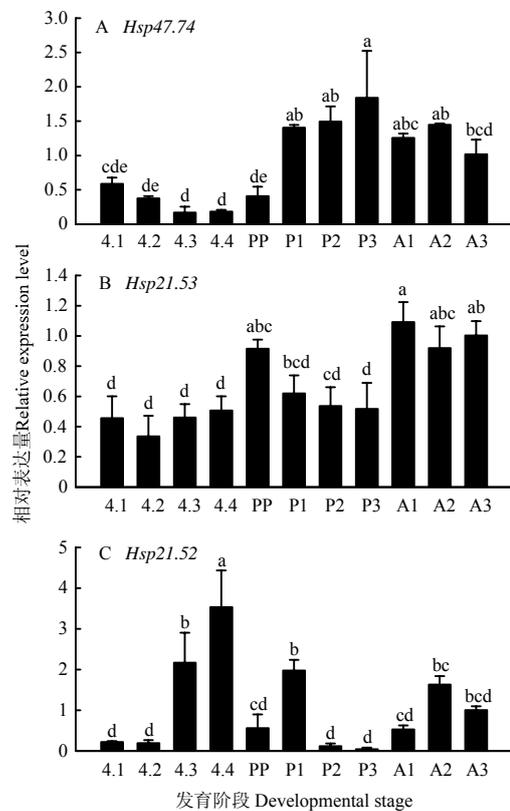
从公司测序得到的异色瓢虫转录组数据库中，找出与 HSP 基因相近的序列，通过比对找出 3 条小分子热激蛋白序列。A: *HaHSP47.74* 开放阅读框为 1 281 bp，翻译氨基酸数 427 个，等电点为 5.82，预测蛋白分子量为 53.88 kD；B: *HaHSP21.53* 开放阅读框为 570 bp，翻译氨基酸数 190 个，等电点为 5.24，预测蛋白分子量为 21.53 kD；C: *HaHSP21.52* 开放阅读框为 576 bp，翻译氨基酸数 192 个，等电点为 5.86，预测蛋白分子量为 21.52 kD。

### 2.2 不同发育阶段异色瓢虫 sHSP 基因的相对表达量

异色瓢虫不同发育阶段：4 龄第 1—4 天幼虫（4.1—4.4）、预蛹（PP）、第 1—3 天蛹（P1—P3）、第 1 至 3 天成虫（A1—A3），其中以羽化后第 3 天成虫（A3）为对照。在蛹期第 3 天 *HaHSP47.74* 表达量显著高于对照组（图 1-A）。*HaHSP21.53* 在成虫第 1 天表达量较高，但与对照组无显著差异（图 1-B）。*HaHSP21.52* 在 4 龄幼虫末期表达量呈上升趋势，且在 4 龄幼虫第 4 天表达量最高显著高于对照组（图 1-C）。

### 2.3 短时降温和短时降温后恢复处理条件下异色瓢虫 sHSP 基因的相对表达量

在短时降温处理中，以 25℃ 时的表达量为参照。*HaHSP47.74* 在 0℃ 和 -5℃ 时表达量与对照组相比显著上调（图 2-A）。*HaHSP21.53* 在 15—5℃ 表达量均显



数值代表平均数，柱形图上的竖线代表标准误，不同字母表示数据在 Tukey's 检验中差异显著（ $P < 0.05$ ）。下同  
Data were presented as means±SE ( $n=3$ ). Bars with different letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test. The same as below

图 1 不同发育阶段实验种群异色瓢虫 sHSP 基因的相对表达水平

Fig. 1 The relative expression level of sHSP genes of *H. axyridis* of experiment population in different instars

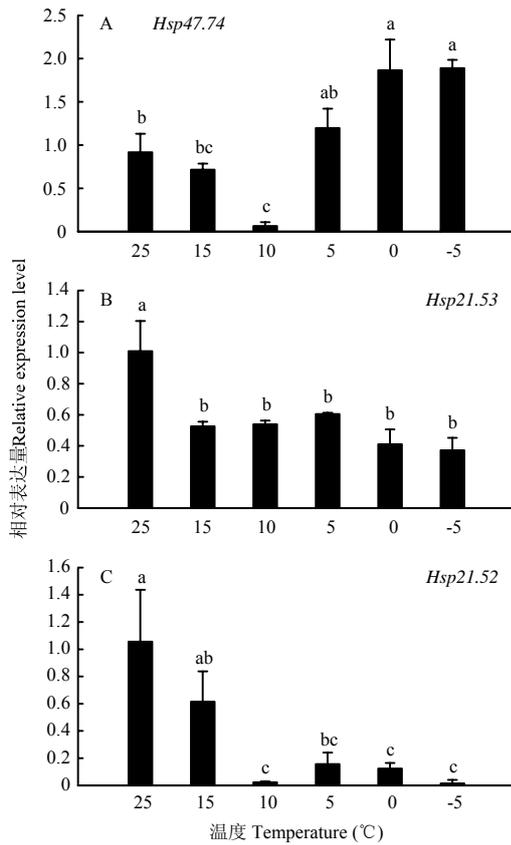


图 2 短时降温条件下实验种群异色瓢虫成虫 sHSP 基因的相对表达水平

Fig. 2 The relative expression level of sHSP genes of adult *H. axyridis* of experiment population under the treatment of cooling process

著低于对照组(图 2-B)。*HaHSP21.52* 在 25°C 时表达量最高, 在 10—5°C 表达量均显著低于对照组(图 2-C)。

在短时降温后恢复处理中, 以 -5°C 时基因表达量为参照。*HaHSP47.74* 在短时升温处理中表达量无显著性差异(图 3-A)。*HaHSP21.53* 在 15°C 时表达量最高, 但与对照组无显著性差异(图 3-B)。*HaHSP21.52* 在 5°C 时表达量最低, 在 5—15°C 表达量呈上升趋势, 但与对照组均无显著差异(图 3-C)。

#### 2.4 低温储存对实验种群和越冬种群异色瓢虫 sHSP 基因的相对表达量的影响

低温储存条件下以 CK (0 d) 为对照。实验种群: 黑雌异色瓢虫 *HaHSP47.74* 在低温储存 5 d 时表达量最高且显著高于对照组, 黄雌异色瓢虫在低温储存 5、10、15 d 时的表达量均显著高于对照组(图

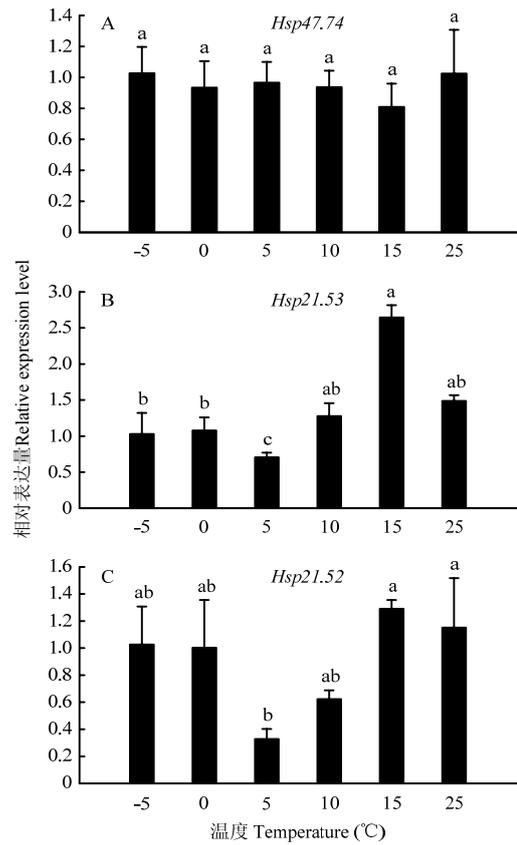


图 3 短时降温后恢复处理下实验种群异色瓢虫成虫 sHSP 基因的相对表达水平

Fig. 3 The relative expression level of sHSP genes of adult *H. axyridis* of experiment population under the treatment of increasing temperature

4-A)。黑雌异色瓢虫 *HaHSP21.53* 在 5—15 d 低温储存条件下表达量呈上升趋势, 且都显著高于对照组, 黄雌瓢虫在 15 d 时表达量最高且显著高于对照组(图 4-B)。黑雌瓢虫 *HaHSP21.52* 在低温储存处理中无显著性高表达, 黄雌瓢虫 *HaHSP21.52* 在低温储存过程中亦无显著性高表达, 且随着储存天数的增加表达量呈下降趋势(图 4-C)。

越冬种群: 黑雌异色瓢虫 *HaHSP47.74* 在低温储存 0—10 d 时表达量呈上升趋势, 在 10—40 d 时表达量呈下降趋势, 但与对照组均无显著差异, 黄雌异色瓢虫 *HaHSP47.74* 在低温储存条件下表达量亦无显著差异(图 5-A)。黑雌异色瓢虫 *HaHSP21.53* 在低温储存 10 d 条件下表达量最高, 但与对照组无显著差异, 黄雌瓢虫 *HaHSP21.53* 表达量与对照组亦无显著差异(图 5-B)。黑雌瓢虫 *HaHSP21.52* 在低温储存处理

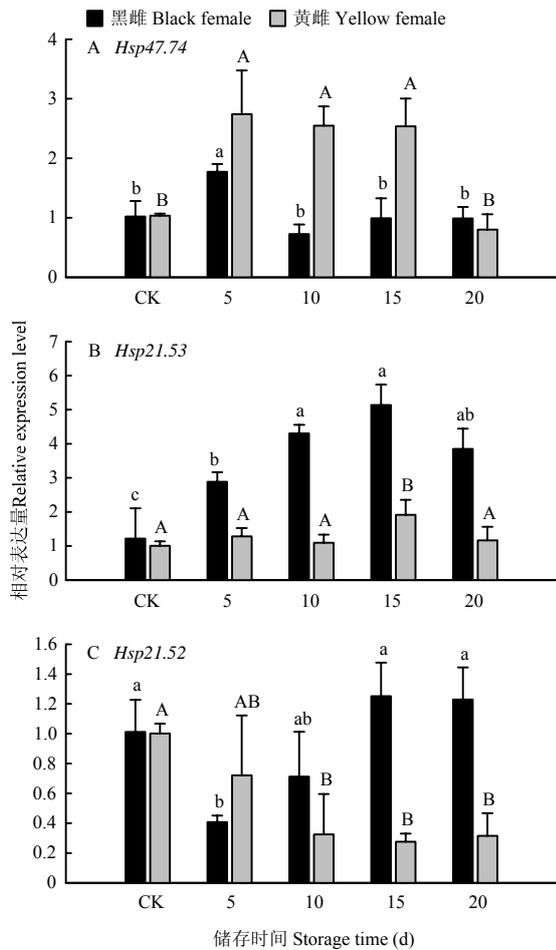


图 4 低温储存条件下实验种群异色瓢虫成虫 sHSP 基因相对表达水平

Fig. 4 The relative expression level of sHSP genes of adult *H. axyridis* of experiment population under the treatment of low temperature storage

60 d 时表达量最高, 且与对照组无显著差异, 黄雌瓢虫 *HaHSP21.52* 在低温储存处理中表达量显著低于对照组 (图 5-C)。

### 3 讨论

HSPs 是一类重要的分子伴侣, 它参与蛋白质折叠和降解、细胞内物质的运输、靶细胞的活性调节等过程<sup>[19]</sup>。当生物体细胞发生损害时, 蛋白质变性失去原本的空间结构和活性功能。这时产生的 HSPs 可以促进肽链重新折叠盘旋, 恢复蛋白质原有的空间结构和生物活性<sup>[20]</sup>。自 RITOSSA<sup>[21]</sup>首次从果蝇中发现 HSPs 以来, 有关 HSPs 的研究报道已经很多。HSPs 具有进化上的保守性, 对于生物体具有重要意

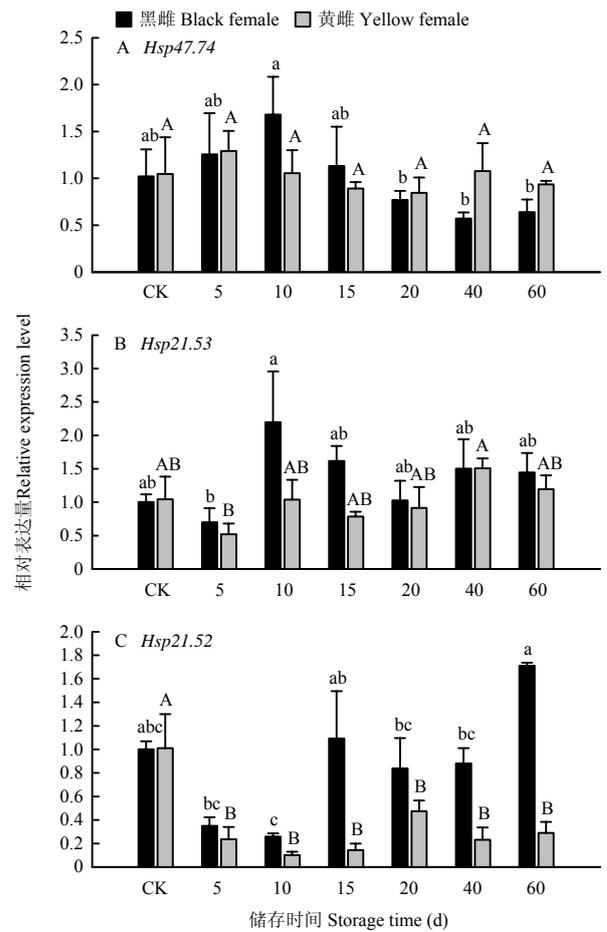


图 5 低温储存条件下越冬种群异色瓢虫成虫 sHSP 基因相对表达水平

Fig. 5 The relative expression level of sHSP genes of adult *H. axyridis* of overwintering population under the treatment of low temperature storage

义, 其普遍存在于各种微生物和动植物体内<sup>[22-23]</sup>。在唐斌等<sup>[24]</sup>的研究中, 将 7 个具有代表性的昆虫 *HSP90* 与异色瓢虫 *HSP90* 进行对比分析, 发现 *HSP90* 具有高度保守性, 同源性高达 81%—90%。异色瓢虫 *HSP70A* 在蛹期和成虫期均有高表达, 升温处理中 *HSP70B* 在 0℃ 时显著性高表达, *HSP70* 表达水平在饥饿处理 8 h 时达到最高, 以上结果表明异色瓢虫 *HSP70* 在发育阶段、升温处理和饥饿处理中均可能起到作用<sup>[25]</sup>。此外, 生物体没有受到外界刺激时, HSPs 也能发挥相应的作用<sup>[26]</sup>。

sHSP 分子量为 15—50 kD<sup>[27]</sup>, 是一个极具多样性的蛋白质家族, 其广泛分布于微生物、高等动植物中。不同组织有不同数目的 sHSP, 分子量也有相当大的

差异<sup>[28]</sup>。昆虫体内的 sHSP 与昆虫的生长发育密切相关<sup>[14]</sup>。研究表明, 生物体无论处于正常状态还是应激状态, sHSP 均有相应的表达<sup>[29]</sup>。家蚕 (*Bombyx mori*) sHSP 基因在家蚕正常生长发育过程中均有表达, 在高温条件下, 重组蛋白 BmHSP24.3 能使底物蛋白免受热刺激胁迫而变性<sup>[30]</sup>。温度亦能够对中华稻蝗 (*Oxya chinensis*) sHSPs 基因的表达产生影响, 但是不同温度处理下各基因的表达模式存在差异<sup>[31]</sup>。正常状态下亦存在表达的 sHSP, 这表明 sHSP 在没有外界刺激时也起到一定的作用<sup>[28,32]</sup>。本研究探索了 sHSP 在异色瓢虫不同发育阶段的表达量, 发现基因在蛹期第 3 天显著性高表达, 在成虫期第 1 天表达量最高, 在 4 龄幼虫第 4 天显著性高表达, 这与笔者实验室前期研究结果较一致<sup>[33]</sup>。

自然界的许多昆虫在越冬前经过自然的逐步降温的过程, 低温胁迫增强了昆虫的抗寒能力, 前人推测在该过程中包括 sHSP 在内的众多基因都起到了作用。田怡<sup>[34]</sup>用不同温度处理橘小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*) 7 日龄成虫, 结果表明 *BdHSP20.4* 和 *BdHSP21.6* 的表达量仅在 -5℃ 显著上调, *BdHSP23.8*、*BdHSP20.6* 和 *BdHSP18.4* 在 -5℃ 和 40℃ 胁迫下均显著上调; 而 *BdHSP17.6* 的相对表达量不会受温度影响; *BdHSP11.1* 的相对表达量经 -5℃ 和 0℃ 胁迫后显著下降; 邬梦静等<sup>[35]</sup>研究了异色瓢虫低温胁迫下过冷却点变化及抗寒基因表达, 发现异色瓢虫小分子热激蛋白 *HSP21.4* 高表达以提高其抗寒能力。根据本研究结果, 发现短时降温条件下 sHSP 基因显著性高表达, 且不同的 sHSP 可能在降温胁迫的不同时期发挥作用, 与实验室前期研究结果较一致。经过低温储藏处理的异色瓢虫 sHSP 的表达量显著上升, 这表明 sHSP 具有保护异色瓢虫抵御寒冷的功能<sup>[33]</sup>。前期试验结果中异色瓢虫 *HSP21.00*、*HSP21.62*、*HSP10.87* 和 *HSP21.56* 在短时降温后恢复处理过程中显著性高表达, 这表明 sHSP 在热激条件下可能发挥着关键作用<sup>[33]</sup>。在本研究短时降温后恢复处理中, 以 -5℃ 时基因表达量为参照, *HaHSP21.53* 在 15℃ 时表达量最高, 但与对照组无显著性差异 (图 3-B), 其他基因无显著性高表达, 不同 sHSP 在短时降温后恢复处理条件下的作用还有待进一步研究。

在温带地区, 冬季对于节肢动物来说是一种巨大的环境压力<sup>[36]</sup>。研究显示, 冷驯化 (特别是 0℃ 和 5

℃) 能显著提高昆虫抗寒性<sup>[37]</sup>。本研究中实验种群在低温储存条件下, 黑雌 *HaHSP47.74* 在储存 5—15 d 时显著性高表达, 黄雌 *HaHSP47.74* 在储存 5 d 时显著性高表达, 黑雌瓢虫 *HaHSP21.53* 在 5—20 d 时显著性高表达, 黄雌瓢虫 *HaHSP21.53* 在 15 d 时显著性高表达。黑雌和黄雌瓢虫 *HaHSP21.52* 表达量均无显著性差异。越冬种群异色瓢虫受到自然界气候驯化, 所以越冬种群的耐寒性高于夏季种群。在 5℃ 条件下对夏季种群进行驯化, 驯化后的夏季种群存活率与越冬种群存活率相接近<sup>[38]</sup>。随着寒冷冬季的到来, 越冬种群的异色瓢虫在生理和行为上都会有所准备, 比如滞育, 降低机体含水量, 降低过冷却点, 积累脂肪, 寻找躲避场所等<sup>[38]</sup>。本研究中的 3 个 sHSP 在越冬种群的低温储存处理中无显著性高表达, 可能这 3 个 sHSP 在异色瓢虫遭受短时升温过程中无明显作用。

异色瓢虫鞘翅色斑呈现季节性变化规律, 这种变异现象可能与保护色有关<sup>[39-40]</sup>。由 *HaHSP47.74* 可看出实验种群黑雌和黄雌异色瓢虫 sHSP 基因两者均能在第 5 天显著性高表达, 但表达量和趋势都有差异 (图 4-A)。导致异色瓢虫色斑呈现多样性的因素有很多, 可能与性交配选择、避免天敌捕食、不同环境条件下酶活力不同等有关, 目前尚无较全面准确的答案, 但是所有这些因素都是为了保持种族繁衍而适应环境所作出的改变<sup>[8,40-41]</sup>。此外, 昆虫冷驯化离不开各种内因和外因。昆虫冷驯化机制复杂多样, 其具体的抗寒机制和遗传关系还有待进一步探索。

## 4 结论

在异色瓢虫生长发育过程中 *HaHSP47.74*、*HaHSP21.53* 和 *HaHSP21.52* 均显著性高表达, 且不同的 sHSP 可能在不同的发育阶段发挥作用。在短时降温处理中, 异色瓢虫 *HaHSP47.74* 显著性高表达以提高其抗寒能力。在短时降温恢复处理中, 3 个 sHSP 基因无显著性高表达。低温储存条件下实验种群黄雌和黑雌的 *HaHSP47.74*、*HaHSP21.53* 均有显著性高表达, 且黄雌和黑雌 sHSP 基因表达量有所差异。低温储存条件下越冬种群 *HaHSP47.74*、*HaHSP21.53*、*HaHSP21.52* 无显著性高表达。综上可预测异色瓢虫同一家族 sHSP 在不同刺激下功能也不尽相同。

## References

- [1] KOCH R L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Sciences*, 2003, 3: 32.
- [2] 王甦, 张润志, 张帆. 异色瓢虫生物生态学研究进展. 应用生态学报, 2007, 18(9): 2117-2126.
- WANG S, ZHANG R Z, ZHANG F. Research progress on biology and ecology of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(9): 2117-2126. (in Chinese)
- [3] LEE R E, DENLINGER D L. *Insects at Low Temperature*. New York: Chapman and Hall, 1991.
- [4] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性研究. 生态学报, 2002, 22(12): 2202-2207.
- JING X H, KANG L. Research progress in insect cold hardiness. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(12): 2202-2207. (in Chinese)
- [5] 郭海波, 许永玉, 鞠珍, 李明贵. 中华通草蛉成虫抗寒能力季节性变化. 生态学报, 2006, 26(10): 3238-3244.
- GUO H B, XU Y Y, JU Z, LI M G. Seasonal changes of cold hardiness of the green lacewing, *Chrysoperla sinica* (Tjeder) (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(10): 3238-3244. (in Chinese)
- [6] WATANABE M. Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 2002, 99: 5-9.
- [7] KOCH R L, CARRILLO M A, VENETTE R C, CANNON C A, HUTCHISON W D. Cold hardiness of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 2004, 33(4): 815-822.
- [8] WANG S, MICHAUD J P, ZHANG R, ZHANG F, LIU S. Seasonal cycles of assortative mating and reproductive behaviour in polymorphic populations of *Harmonia axyridis* in China. *Ecological Entomology*, 2009, 34(4): 483-494.
- [9] MICHE L J, MASSON A, WARE R L, JIGGINS F M. Seasonal phenotypic plasticity: wild ladybirds are darker at cold temperatures. *Evolutionary Ecology*, 2011, 25(6): 1259-1268.
- [10] RUAN C C, DU W M, WANG X M, ZHANG J J, ZANG L S. Effect of long-term cold storage on the fitness of pre-wintering *Harmonia axyridis* (Pallas). *Biological Control*, 2012, 57(1): 95-102.
- [11] LABRIE G, CODERRE D, LUCAS É. Overwintering strategy of multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae): cold-free space as a factor of invasive success. *Annals of the Entomological Society of America*, 2008, 101(5): 860-866.
- [12] 唐芬芬, 邵榆岚, 杨伟克, 杨海, 李平平, 李腾芳, 白兴荣. 昆虫响应非生物胁迫——表达热休克蛋白策略的研究进展. 中国农学通报, 2013, 29(30): 181-184.
- TANG F F, SHAO Y L, YANG W K, YANG H, LI P P, LI T F, BAI X R. Advance on insect strategy of expressing heat shock protein to response abiotic stress. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(30): 181-184. (in Chinese)
- [13] 王国强. 小分子热休克蛋白生物学功能的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 9946-9947, 9949.
- WANG G Q. Research progress in biology function of small heat shock protein. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(19): 9946-9947, 9949. (in Chinese)
- [14] 郭虹霞, 王创云, 赵丽, 王陆军, 王晋, 侯雅静, 郭晶心. 小分子热激蛋白的研究进展. 山西农业科学, 2013, 41(12): 1421-1423.
- GUO H X, WANG C Y, ZHAO L, WANG L J, WANG J, HOU J Y, GUO J X. Research progress of small heat shock protein. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2013, 41(12): 1421-1423. (in Chinese)
- [15] 赵静, 肖达, 李晓莉, 许永玉, 王甦. 异色瓢虫不同色斑型成虫的耐寒性研究. 应用昆虫学报, 2015, 52(2): 428-433.
- ZHAO J, XIAO D, LI X L, XU Y Y, WANG S. Cold tolerance of different adult elytral color morphs in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2015, 52(2): 428-433. (in Chinese)
- [16] SHI Z K, LIU X J, XU Q Y, QIN Z, WANG S, ZHANG F, WANG S G, TANG B. Two novel soluble trehalase genes cloned from *Harmonia axyridis* and regulation of the enzyme in a rapid changing temperature. *Comparative Biochemistry Physiology*, 2016, 198B: 10-18.
- [17] 汪慧娟, 施佐堃, 徐风娇, 沈祺达, 徐燕霞, 王世贵, 唐斌. 异色瓢虫多巴脱羧酶基因序列及低温诱导表达分析. 环境昆虫学报, 2016, 38(2): 271-279.
- WANG H J, SHI Z K, XU F J, SHEN Q D, XU Y X, WANG S G, TANG B. Gene sequence and expression analysis of Dopa decarboxylase in *Harmonia axyridis* under low temperature induction. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38(2): 271-279. (in Chinese)
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

- [19] 黄惠芳, 马飞. 热激蛋白的分子进化研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(增刊):166-170.  
HUANG H F, MA F. The molecular evolution of heat shock proteins. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(Suppl.): 166-170. (in Chinese)
- [20] MOSELEY P L. Heat shock proteins and heat adaption of the whole organism. *Journal of Applied Physiology*, 1997, 83(5): 1413-1417.
- [21] RITOSSA F M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Experimental Cell Research*, 1964, 35(3): 601-607.
- [22] 唐斌, 林青青, 邬梦静, 施兴荣, 王世贵. 抗寒类蛋白与冷驯化诱发昆虫耐寒的生理调节研究. 环境昆虫学报, 2014, 36(5): 805-813.  
TANG B, LIN Q Q, WU M J, SHI X R, WANG S G. The physiological regulation of hardy proteins and induce insect's cold-resistance by cold acclimation. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36(5): 805-813. (in Chinese)
- [23] 陈莉. 柞蚕热激蛋白 90 基因的克隆与表达分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.  
CHEN L. Cloning and expression analysis of *Hsp90* gene from Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [24] 唐斌, 王世贵, 王峰巍, 庞虹, 张帆. 异色瓢虫的 HSP90 基因的克隆与特性分析. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 49(2): 72-78.  
TANG B, WANG S G, WANG F W, PANG H, ZHANG F. Cloning and characterization analysis of heat shock protein 90 gene from *Harmonia axyridis* (Pallas). *Acta Scientiarum Naturalium Sun Yat-sen University*, 2010, 49(2): 72-78. (in Chinese)
- [25] SHEN Q D, ZHAO L N, XIE G Q, WEI P, YANG M M, WANG S G, TANG B. Cloning three *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) heat shock protein 70 family genes: regulatory function related to heat and starvation stress. *Journal of Entomology Science*, 2015, 50(3): 168-185.
- [26] 郑井元. 松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)热激转录因子(HSF)的分离及 HSP70 基因功能的 RNAi 分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.  
ZHENG J Y. Isolated of heat shock transcription factor (HSF) and analysis of HSP70 by RNAi in *Bursaphelenchus xylophilus*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [27] 王瑞娟, 高瑞娜, 张婷, 赵国栋, 李兵, 卫正国, 沈卫德. 外源物质诱导家蚕小分子热激蛋白基因 HSP19.9 的组织表达活性分析. 蚕业科学, 2010, 36(5): 780-784.  
WANG R X, GAO R N, ZHANG T, ZHAO G D, LI B, WEI Z G, SHEN W D. An analysis of tissue expression activities of *Bombyx mori* molecule heat shock protein gene *HSP19.9* induced by exogenous substances. *Science of Sericulture*, 2010, 36(5): 780-784. (in Chinese)
- [28] 李斌, 夏庆友, 藤井博, 伴野丰, 鲁成. 低分子量热激蛋白的进化研究. 蚕业科学, 2004, 30(3): 260-265.  
LI B, XIA Q Y, HIROSHI F, YUTAKA B, LU C. Phylogenesis and evolution of small heat shock proteins. *Science of Sericulture*, 2004, 30(3): 260-265. (in Chinese)
- [29] 李显航, 刘红美. 家蝇小热休克蛋白(sHsp20.6)的生物信息学分析. 生物信息学, 2013, 11(1): 65-71.  
LI X H, LIU H M. Bioinformatic analysis of small heat shock protein (sHsp20.6) in *Musca domestica* L. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 2013, 11(1): 65-71. (in Chinese)
- [30] 刘彬斌. 家蚕低分子量热激蛋白基因克隆、表达及功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.  
LIU B B. Study on small heat shock proteins genes in the silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2007. (in Chinese)
- [31] 史学凯, 寇利花, 张育平, 马恩波, 张建珍, 吴海花. 温度对中华稻蝗小分子热休克蛋白基因表达的影响. 应用昆虫学报, 2016, 53(6): 1267-1273.  
SHI X K, KOU L H, ZHANG Y P, MA E B, ZHANG J Z, WU H H. Effects of temperature on the expression patterns of *Ocs HSP* genes in *Oxya chinensis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53(6): 1267-1273. (in Chinese)
- [32] 李斌, 夏庆友, 孙卫忠, 鲁成, 周泽扬. 昆虫 sHSP 基因的系统进化研究. 蚕业科学, 2003, 29(4): 340-343.  
LI B, XIA Q Y, SUN W Z, LU C, ZHOU Z Y. Evolution of the small heat-shock proteins in class of insect. *Science of Sericulture*, 2003, 29(4): 340-343. (in Chinese)
- [33] WANG H J, SHI Z K, SHEN Q D, XU C D, MENG Z J, WANG S G, TANG B, WANG S. Molecular cloning and induced expression of six small heat shock protein mediating cold-hardiness in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 60.
- [34] 田怡. 基于转录组数据库的柞小实蝇 sHSP 基因的挖掘及功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.  
TIAN Y. Mining and function analysis of small heat shock protein

- genes in *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome database[D]. Chongqing: Southwest University, 2015. (in Chinese)
- [35] 邬梦静, 徐青叶, 刘雅, 施兴荣, 沈祺达, 杨萌萌, 王世贵, 唐斌. 异色瓢虫低温胁迫下过冷却点变化及抗寒基因表达分析. 中国农业科学, 2016, 49(4): 677-685.
- WU M J, XU Q Y, LIU Y, SHI X R, SHEN Q D, YANG M M, WANG S G, TANG B. The super cooling point change of *Harmonia axyridis* under low temperature stress and its cold-resistance genes' expression analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(4): 677-685. (in Chinese)
- [36] KANG L, CHEN B, WEI J N, LIU T X. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control. *Annual Review of Entomology*, 2009, 54: 127-145.
- [37] BROUFAS G D, KOVEOS D S. Rapid cold hardening in the predatory mite *Euseius (Amblyseius) finlaandicus* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Insect Physiology*, 2001, 47(7): 699-708.
- [38] 赵静, 于令媛, 李敏, 郑方强, 张帆, 许永玉. 异色瓢虫成虫耐寒能力的季节性变化. 昆虫学报, 2008, 51(12): 1271-1278.
- ZHAO J, YU L Y, LI M, ZHENG F Q, ZHANG F, XU Y Y. Seasonal variation in cold tolerance of the multicolored ladybeetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) adults. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(12): 1271-1278. (in Chinese)
- [39] WANG S, MICHAUD J P, TAN X L, ZHANG F, GUO X J. The aggregation behavior of *Harmonia axyridis* in its native range in Northeast China. *Biological Control*, 2011, 56(2): 193-206.
- [40] 谈家桢, 胡楷. 异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)鞘翅色斑二个新等位基因和嵌镶显性遗传学说的再证实. 动物学研究, 1980, 1(3): 277-285.
- TAN J Z, HU K. On two new alleles of the color pattern gene in the lady-beetle *Harmonia axyridis* and further proof of the mosaic dominance theory. *Zoological Research*, 1980, 1(3): 277-285. (in Chinese)
- [41] 唐斌, 诸信, 郭红双, 方丹, 沈祺达, 郑笑笑, 王世贵, 张帆, 王甦. 异色瓢虫鞘翅色斑变异多样性研究进展. 杭州师范大学学报 (自然科学版), 2012, 11(2): 132-136.
- TANG B, ZHU J, GUO H S, FANG D, SHEN Q D, ZHENG X X, WANG S G, ZHANG F, WANG S. Studies of the diversity of multiple elytral color morphs of *Harmonia axyridis* (Pallas). *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2012, 11(2): 132-136. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)