

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240089



主持人: 缪卫国

草地贪夜蛾的冷识别温度及低温胁迫下 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的响应

田彩虹¹, 张俊逸^{1,2}, 党菁³, 黄建荣¹, 尹新明², 李国平¹, 封洪强¹

(1. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 农业农村部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室, 河南省作物保护国际联合实验室, 河南省生物农药工程研究中心, 郑州 450002; 2. 河南农业大学 植物保护学院, 河南省害虫绿色防控国际联合实验室, 郑州 450002; 3. 禹州市科学技术局, 河南 禹州 461670)

摘要: 为了探究草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 幼虫和蛹的抗寒能力, 室内测定了草地贪夜蛾 1~6 龄幼虫和蛹在低温条件下的死亡率, 拟合线性回归方程, 统计各发育阶段的冷识别温度, 得到 1~6 龄幼虫和蛹的冷识别温度分别为 -7.80 °C、-9.70 °C、-9.61 °C、-8.78 °C、-8.29 °C、-8.05 °C 和 -9.51 °C。通过实时荧光定量 PCR 对常温饲养和低温处理的草地贪夜蛾的 *Hsp70* 基因 (GenBank 登录号: NC_064223.1) 和 *Hsp90* 基因 (GenBank 登录号: MN832694) 进行表达分析, 结果表明 2 种处理的草地贪夜蛾的 *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因在不同发育阶段表达量均不同, 经过低温处理后, *Hsp70* 基因在 1 龄幼虫中表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在 2~6 龄幼虫和蛹中表达量极显著增加 ($P < 0.01$); *Hsp90* 基因在 1~6 龄幼虫中表达量极显著增加 ($P < 0.01$), 在蛹中表达量极显著降低 ($P < 0.01$)。

关键词: 草地贪夜蛾; 冷识别温度; *Hsp70*; *Hsp90*; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054 (2024) 06-0664-08

田彩虹, 张俊逸, 党菁, 等. 草地贪夜蛾的冷识别温度及低温胁迫下 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的响应 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(6): 664-671. doi:10.15886/j.cnki.rdswwb.20240089

草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 属鳞翅目夜蛾科, 是一种迁飞性农作物害虫, 原产于美洲热带及亚热带地区。2018 年 12 月 11 日, 在中国云南西部地区首次发现有草地贪夜蛾迁入^[1], 其寄主广泛, 幼虫可为害多种粮食作物, 并且具有适生区域广、迁飞速度快、繁殖能力强、防控难度大的特点, 不防治或防治不及时, 可造成 30%~50% 的产量损失, 目前逐步在我国定殖, 对我国粮食安全生产威胁巨大^[2]。根据草地贪夜蛾的发生规律和防控需要, 将其发生区分为周年繁殖区、迁飞过渡区和重点防范区, 黄淮海地区作为草地贪夜蛾的重点防范区, 面临着巨大的防控压力。

环境胁迫是影响草地贪夜蛾生命活动的重要因素之一, 在环境中的分布和丰度取决于该虫对环境变化的适应能力。草地贪夜蛾在冬季没有滞育特性, 在中国北方大部分地区无法越冬^[3], 近年来对草地贪夜蛾越冬情况的研究结果表明, 我国草地贪夜蛾周年繁殖区位于 28°N 以南, 即 1 月份平均温度 10 °C 等温线以南区域; 越冬区在 28°~31°N 之间, 即 1 月份平均温度 6~10 °C 等温线之间^[4]。草地贪夜蛾具有一定的耐低温能力, 但连续 10 d 左右的 10 °C 以下环境可使其幼虫全部死亡^[5], 连续 35 d 7 °C 的低温环境可使其幼虫、蛹、成虫全部死亡^[6]。昆虫在长期的进化过程中,

收稿日期: 2024-05-30

修回日期: 2024-09-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1400701); 河南省科技攻关项目 (232103810016); 2024 年度省级科技研发计划联合基金项目; 河南省重大专项 (201300111500); 河南省农业科学院科技创新团队 (2024TD30)

第一作者: 田彩虹 (1976-), 女, 副研究员。研究方向: 农业昆虫与害虫防治。E-mail: caihongtian@126.com

通信作者: 李国平 (1976-), 女, 研究员。研究方向: 农业昆虫与害虫防治。E-mail: liguoping1976@163.com;

封洪强 (1973-), 男, 研究员。研究方向: 农业昆虫与害虫防治。E-mail: feng_hq@163.com

形成了对突然和不可预测的温度变化的迅速冷识别的能力有助于其低温生存,特别是在春季和秋季,季节适应性不完全或消退时,几分钟内可被低温诱导,提高存活率,并保护其免受冷休克造成的伤害,在草地贪夜蛾中是否有这种现象目前尚未见报道。

目前对草地贪夜蛾抗寒能力的研究多为过冷却点及结冰点的测定、不同环境或生长条件对其过冷却点及结冰点的影响。过冷却点和结冰点能够反映昆虫的耐寒性强弱,在昆虫的耐寒性研究方面具有重要意义^[7-8],但越来越多的研究结果发现,当环境温度或昆虫体温高于其过冷却点时也会出现大量的死亡,昆虫的耐寒能力并不能仅依赖过冷却点判断,一种昆虫的耐寒性强弱最终取决于其低温存活率^[9]。目前,草地贪夜蛾在河南省不能越冬,本课题组于2020年10月25日在河南省新乡市新乡县小冀镇张后线东段晚播青贮玉米田玉米嫩穗部和2021年11月2日在河南省太康县小麦田小麦根部均发现了6龄幼虫活虫,因此,还需要进一步测定其冷识别温度。

昆虫是一种变温动物,易受外界环境影响,气象因素中温度对昆虫的影响最显著,在昆虫的生长发育、生存、生殖和行为等多方面都具有重要影响^[10]。昆虫对极端温度胁迫的响应包括行为上的躲避和分子水平上的基因调控等。热激蛋白(heat shock proteins, *Hsp*)又称热休克蛋白,早期研究认为是生物在高温胁迫时表达提高的一类蛋白质,随后发现 *Hsp* 基因可被高温、低温、高盐和紫外线等多种因素诱导,*Hsp* 的高表达是生物抵抗不良环境的一种方法^[11]。*Hsp70* 和 *Hsp90* 蛋白具有应激诱导表达特性,其表达量和昆虫应对环境胁迫的能力密切相关,低温下,这两个基因的应激表达反应如何,目前尚未见报道。

本研究在实验室条件下测定了草地贪夜蛾1~6龄幼虫和蛹的冷识别温度,并进一步利用荧光定量PCR技术研究了在冷识别温度下处理3h后的 *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因的体外表达以明确草地贪夜蛾幼虫和蛹的冷识别温度, *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因在响应低温环境胁迫中的表达,为探究草地贪夜蛾适应低温环境胁迫的机理,制定科学的防治策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫 草地贪夜蛾5龄幼虫于2021年10月25日采自河南省新乡市新乡县小冀镇张后线东段(113.876 105° E, 35.220 885° N),在温度为(26 ± 1)°C,光周期为L/D=14 h/10 h的实验室内使用人工饲料继代饲养^[12]。

1.2 草地贪夜蛾幼虫和蛹的冷识别温度测定 将供试昆虫在低温环境中处理3 h,温度从正常饲养温度26.0 °C逐步降低,致使供试昆虫死亡率为80%的温度即为冷识别温度^[13]。根据预实验的结果,在一定温度范围内,草地贪夜蛾幼虫和蛹的死亡率随着温度的降低而升高,当温度为-11 °C及以下时,幼虫和蛹的死亡率均达到100%,据此,温度设置为-3 °C、-4 °C、-5 °C、-6 °C、-7 °C、-8 °C、-9 °C、-10 °C和-11 °C,测定时将试虫直接放置在养虫盒内,再放进低温冷光源人工气候箱(LED-R-400A,宁波扬辉仪器有限公司)进行处理,为防止幼虫自残,在养虫盒(下底直径×上口直径×高=28 mm × 38 mm × 30mm)内放入人工饲料及滤纸条制造隔离障碍,蛹则直接放入养虫盒内。每个处理20头供试昆虫,各处理重复3次,各处理对照组为人工气候箱中正常饲养的对应虫态的草地贪夜蛾。处理结束后在温度为26 °C,湿度为70%的人工气候箱中正常饲养,72 h后统计存活状况,用毛笔轻触,不能协调运动的试虫记录为死亡^[13],计算校正死亡率。供试草地贪夜蛾蛹为群养化蛹,从观察到有化蛹现象之后的第3天开始用于试验,随机挑选发育正常的蛹供试。

校正死亡率(%)=(处理死亡率-对照死亡率)/(100-对照死亡率)×100

1.3 草地贪夜蛾 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的表达分析 选取草地贪夜蛾1~6龄幼虫、蛹,按照100 mg上述组织放入装有1 mL Invitrogen TRIzol,加适量液氮迅速充分研磨,按照说明书提取得到总RNA,用DNase I酶消化后,用NanoDrop™检测并记录其浓度,保证OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8~2.0之间。用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的质量,以上处理重复3次,样品于-20 °C保存。

以草地贪夜蛾总RNA为模板,使用Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA (TaKaRa)反转录试剂盒,按照说明书合成cDNA第一链。通过比对

已知同源昆虫棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*),甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因序列及已发表文献^[14],在保守区采用Primer 5.0软件设计引物(表1),使用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(TaKaRa)按照说明进行 RT-qPCR 反应。RT-qPCR

反应:荧光定量PCR采用 20 μL PCR 反应体系:2× SuPerReal PreMix Plus 10 μL、正向和反向引物各 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL、ROX Reference Dye (50x) 0.4 μL、RNase-free ddH₂O 6.8 μL;反应条件:95 °C预变性 1 min,95 °C变性 30 s,60 °C退火 30 s,共40个循环。

表 1 草地贪夜蛾实时荧光定量PCR引物信息
Tab. 1 Quantitative real-time PCR primers information of *S. frugiperda*

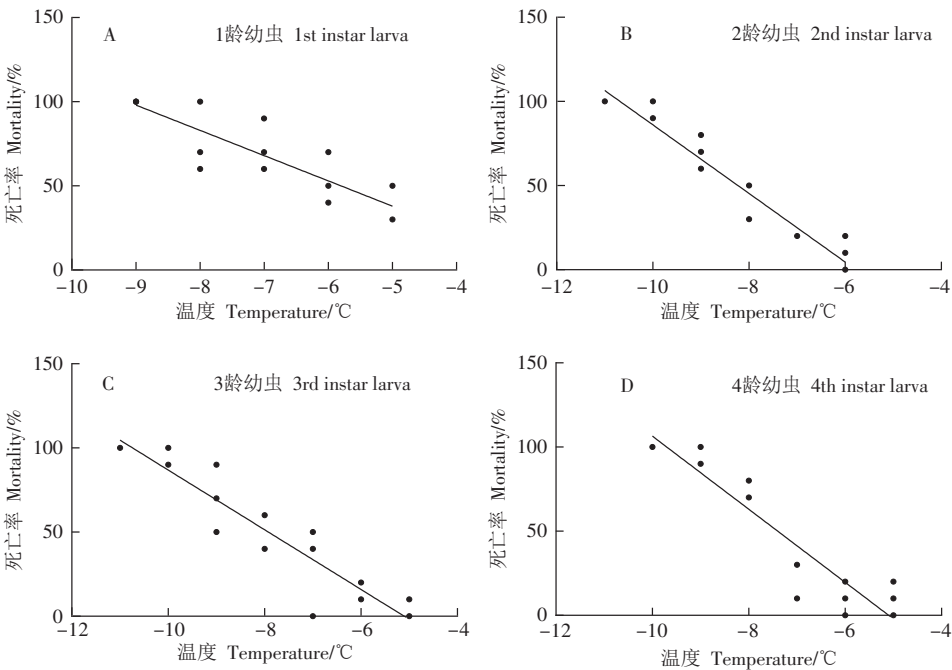
引物名称 Primers	引物序列 Sequences of Primers	引物用途 Usage of Primers
<i>Hsp70</i> -F	CTGCCGTCGAGAAGTCTACC	实时荧光定量PCR Quantitative Real-time PCR
<i>Hsp70</i> -R	AGTCCTGTACTTCTCGGCCT	
<i>Hsp90</i> -F	CGTCTTCATCACCACGAGT	
<i>Hsp90</i> -R	TCACGACTCTCGTTTAGCGG	
<i>Actin</i> -F	TACTCCTAAGCCTGTTGATG	内参基因 Reference gene
<i>Actin</i> -R	TTATGTCATGGTGCCGAAT	

1.4 数据分析 分析死亡率与处理温度的关系,得到死亡率与处理温度的关系方程,采用线性回归函数拟合死亡率与温度的关系,并计算达到 80% 死亡率时的温度,即为冷识别温度。*Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的相对表达量以草地贪夜蛾雌蛾 *Actin* 基因的表达量为基准^[15],利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因表达的差异^[16],实验数据结果参考田彩虹等统计学分析方法^[17],采用3次生物学实验重复,取3次实验重复的标准差作为误差;使用独立样本 t 检验进行两组数据间的差异显著性分析,同一处理不同数据间差异显著性采用单因素方差分析,

采用 SPSS 24.0 软件中的 Duncan 氏多重比较对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾幼虫和蛹的冷识别温度 冷识别温度测定结果表明,在一定温度范围内,草地贪夜蛾幼虫和蛹的死亡率随着温度的降低而升高,当温度为-11 °C时,幼虫和蛹的死亡率均可达到100%。线性回归分析结果表明,处理温度与死亡率之间存在显著线性相关性,通过线性回归方程计算死亡率为80%时的处理温度,即为草地贪夜蛾在该发育阶段的冷识别温度(图1)。1~6龄草



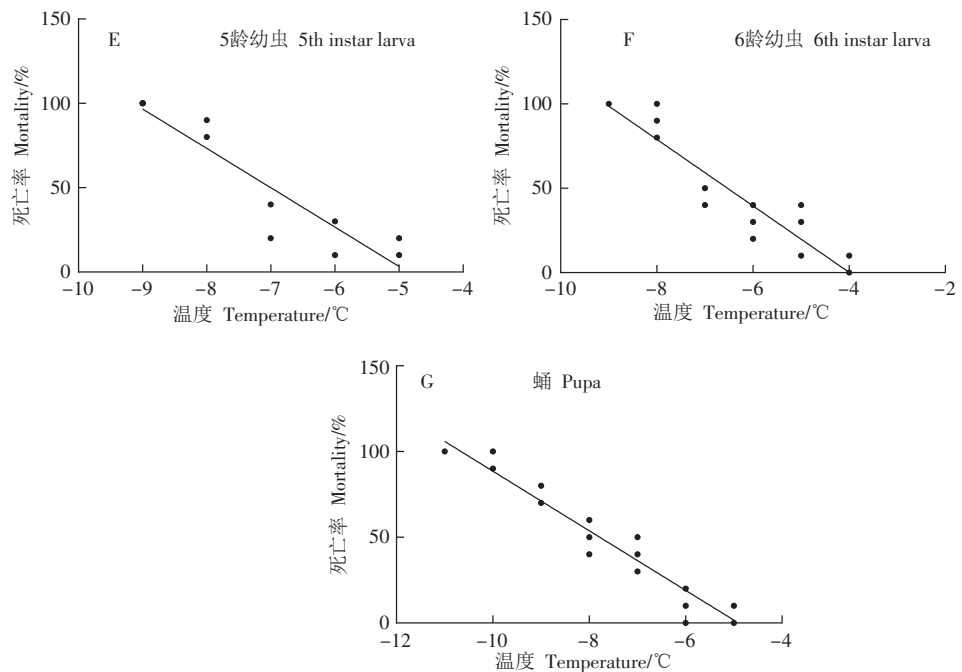


图 1 草地贪夜蛾 1~6 龄幼虫和蛹的低温死亡率

A ~ G 分别为 1~6 龄幼虫和蛹的低温死亡率; 黑色圆点表示 1 个重复处理的死亡率, 每个温度 3 次重复, 每个重复 20 头供试昆虫。

Fig. 1 Mortality of 1st~6th instar larvae and pupae of *S. frugiperda* exposed to low temperature

A ~ G are 1st ~ 6th instar larvae and pupae, respectively; black dots represent the mortality rate of 1 replicate treatment, with 3 replicates per temperature and 20 test insects per replicate.

地贪夜蛾幼虫和蛹的冷识别温度分别为-7.80 °C、-9.51 °C, 幼虫阶段抗寒能力呈先增加再减弱趋势(表 2)。

表 2 草地贪夜蛾 1~6 龄幼虫冷识别温度

Tab. 2 Discriminating temperatures for 1st~6th instar larvae of *S. frugiperda*

虫态 Stage	回归方程 Regression equation	R^2	冷识别温度/°C Discriminating temperature
1 龄幼虫 1st instar	$y=-0.15x-0.370$	0.968 0	-7.80
2 龄幼虫 2nd instar	$y=-0.203\ 8x-1.176\ 8$	0.960 2	-9.70
3 龄幼虫 3rd instar	$y=-0.177\ 4x-0.904\ 8$	0.979 2	-9.61
4 龄幼虫 4th instar	$y=-0.217\ 1x-1.106\ 3$	0.906 4	-8.78
5 龄幼虫 5th instar	$y=-0.233\ 3x-1.133\ 3$	0.890 9	-8.29
6 龄幼虫 6th instar	$y=-0.197\ 1x-0.787$	0.940 5	-8.05
蛹 Pupae	$y=-0.173\ 8x-0.852\ 4$	0.972 4	-9.51

2.2 草地贪夜蛾 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的表达分析 qRT-PCR 结果表明, 常温(26 ± 1) °C 对照处理中, *Hsp70* 基因在 1 龄幼虫中表达量最高, 在 2 龄幼虫和蛹中表达量最低, *Hsp90* 基因在蛹期表达量最高, 1 龄幼虫次之(图 2-A)。各发育虫态的草地贪夜蛾在冷识别温度处理后, *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因均在 1 龄幼虫中相对表达量最高(图 2-B)。

不同发育阶段的草地贪夜蛾, 以常温(26 ± 1) °C 处理作为对照, 在冷识别温度处理下的 *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因体外表达分析结果表明, 经过低温处理后, *Hsp70* 基因在 1 龄幼虫中表达量显著降低($P < 0.05$), 在 2~6 龄幼虫和蛹中表达量极显著增加($P < 0.01$); *Hsp90* 基因在 1~6 龄幼虫中表达量极显著增加($P < 0.01$), 在蛹中表达量极显著降低($P < 0.01$)(图 2-C、D)。

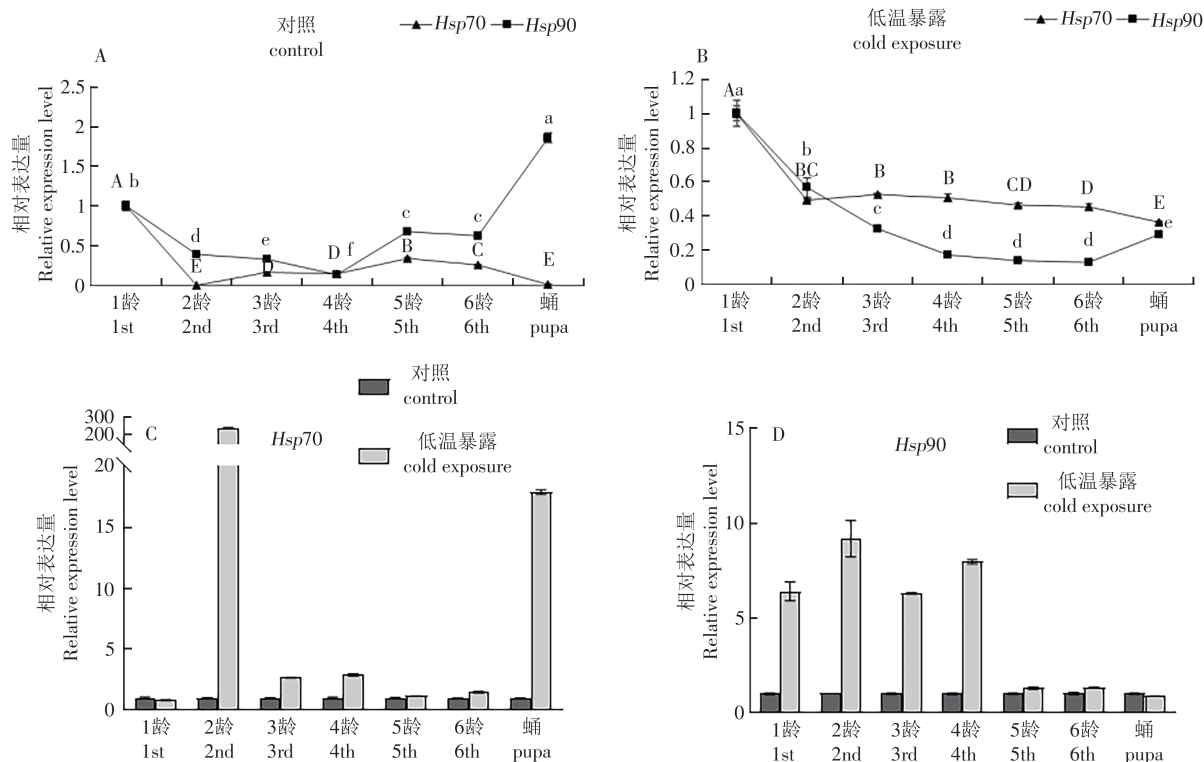


图2 *Hsp70*基因和*Hsp90*基因在不同处理草地贪夜蛾中的表达量

图A、B中大写字母表示不同发育虫态处理间*Hsp70*基因表达差异显著性,小写字母表示不同发育虫态处理间*Hsp90*基因表达差异显著性。

Fig. 2 The expression levels of *Hsp70* gene and *Hsp90* gene in *S. frugiperda* at different temperatures

In Figs. A and B, the uppercase letters indicate the significant difference between *Hsp70* treatments, and the lowercase letters indicate the significant difference between *Hsp90* treatments.

3 讨论

草地贪夜蛾逐步在我国定殖,目前已成为当地各季玉米的重要害虫,入侵前全玉米生育期只防治1~2次,目前普遍需防治3~6次,导致生产成本增加。明确草地贪夜蛾的冷识别温度尤为重要,对明确草地贪夜蛾在我国的定殖地具有参考意义。目前,专家学者通过测定草地贪夜蛾的过冷却点和结冰点研究草地贪夜蛾的耐寒能力,发现不同地区、不同温度处理、不同食料饲养的草地贪夜蛾过冷却点及结冰点在3~6龄幼虫均为逐渐升高^[18-20],其中,罗举等^[18]的结果表明2龄幼虫过冷却点与结冰点低于1龄幼虫,2~6龄幼虫过冷却点与结冰点逐渐升高,本研究的冷识别温度变化趋势与之相吻合,但是这些研究测定的过冷却点及结冰点结果均偏低,与田间越冬调查情况不符^[5-6],也有很多昆虫未到达其过冷却点便出现死亡^[21]。因此,过冷却点与结冰点并不能准确反映

昆虫的抗寒能力,冷识别温度更能与田间发生实际相拟合。

目前在草地贪夜蛾不同发育阶段耐寒能力方面有较多的研究,但并未见具体的草地贪夜蛾的冷识别温度的研究。本文不同龄期草地贪夜蛾冷识别温度变化趋势与张同强等^[22]的过冷却点温度变化相似。Foster和Cherry在低温箱中处理草地贪夜蛾3 h,结果表明不同虫态的耐寒力由强到弱依次为卵>低龄幼虫>蛹>成虫^[23]。邱良妙等通过测定草地贪夜蛾在0℃条件下不同发育阶段存活率评估其抗寒能力,结果表明抗寒能力由强到弱依次为1龄幼虫>2龄幼虫>蛹>3龄幼虫>4龄幼虫>5龄幼虫>6龄幼虫^[24],均为2~6龄幼虫抗寒能力逐渐降低,蛹的抗寒能力强于4~6龄幼虫,可能由于供试昆虫来自不同地理种群及实验方法和处理温度造成一定差异。本研究中,虽然2龄幼虫和3龄幼虫冷识别温度低于蛹的冷识别温度,邱良妙等的研究结果表明在0℃以上低温处理条件下

蛹的抗寒能力更强^[24], 推测实验中温度变化较快, 会引起一定的误差, 蛹较低龄幼虫相比体内积累了更多的营养物质, 因此在长期且缓慢降低温度的野外条件下更适宜越冬。

Hsp70 基因和 *Hsp90* 基因属于热激蛋白 Hsps, 是生物进化过程中最保守的蛋白家族之一, 在面对多种环境胁迫时, 生物会通过热激蛋白的表达与调控进行自我保护^[25]。比如绿豆象 (*Callosobruchus chinensis*)^[26]、马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata*)^[27]、褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*)^[28] 在高温胁迫条件下体内的 *Hsp70* 基因或者 *Hsp90* 基因表达量会显著提升。同时, 诸多研究表明低温胁迫同样能引起 *Hsp70* 基因或 *Hsp90* 基因的高表达, 比如马铃薯甲虫^[27]、褐飞虱^[28]、香梨优斑螟 (*Euzophera pyriella*)^[29] 会提高 *Hsp70* 基因或者 *Hsp90* 基因表达量来抵抗低温胁迫。本研究结果表明, 经过低温胁迫后, 草地贪夜蛾 2~6 龄幼虫和蛹体内 *Hsp70* 基因表达量显著提高, *Hsp90* 基因在 1~6 龄幼虫中表达量显著提高, 推测 *Hsp70* 基因在幼虫和蛹期抵抗不良环境中起主要作用, *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因共同参与幼虫阶段对低温胁迫的反应。

通过 qRT-PCR 检测 *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因在不同温度处理和不同发育阶段的相对表达量, 常温对照的 *Hsp70* 基因、低温处理的 *Hsp70* 基因和 *Hsp90* 基因在幼虫和蛹中均为 1 龄幼虫表达量最高, 显著高于其他龄期和蛹的表达量, 与 *Hsp70* 在韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia cellarum*) 不同发育阶段的表达模式相同^[30], 可能是因为 1 龄幼虫体积小, 相对表面积较大, 对环境变化敏感, 易受环境温度影响, *Hsp* 基因的高表达有助于提高抵抗不良环境的能力。而在沙葱莹叶甲 (*Galeruca daurica*) 中, *Hsp70* 基因在卵期表达量高^[31], 推测 *Hsp70* 基因在不同物种间的表达模式存在一定差异。 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因在 2 个处理不同发育阶段表达量均存在一定差异, 表明 *Hsp* 基因在不同发育阶段表达具有特异性^[32]。

一些昆虫在较低温度下处理一段时间后会提升耐寒能力, 即低温驯化^[33], 低温驯化提高耐寒性在三叶斑潜蝇 (*Liriomyza trifolii*)^[34]、梨小食心虫 [*Grapholita molesta* (Busck)]^[35]、油松毛虫 (*Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu)^[36]、莲草直胸跳甲 (*Agasicles hygrophila*)^[37] 等昆虫中均得到验证。本

研究表明, 低温处理会使草地贪夜蛾的 *Hsp70* 基因及 *Hsp90* 基因高表达, 推测低温驯化使昆虫体内 *Hsp* 基因高表达, 从而提高昆虫的耐寒能力。Sejerkilde 等认为温度驯化诱导热激蛋白的表达是昆虫温度胁迫耐受性的主要作用机制^[38]。

害虫在每年冬季忍受最低温之前, 还需要忍受非常长一段时间的亚低温环境, 存在低温驯化的情况。随着全球气候变化和种植制度的改变, 多数昆虫的越冬线北移, 例如大螟 (*Sesamia inferens*)^[39] 和橘小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*)^[40] 等, 在草地贪夜蛾中是否有这种情况, 有待于将来进一步研究。本研究明确了草地贪夜蛾的冷识别温度, 表明草地贪夜蛾 *Hsp70* 基因及 *Hsp90* 基因在不同发育阶段表达量不同, 低温胁迫会诱导其高表达, 在草地贪夜蛾抵抗低温胁迫时发挥重要作用, 初步为草地贪夜蛾抗寒能力及对低温胁迫的分子机制奠定前期理论基础。

参考文献:

- [1] SUN X, HU C, JIA H, et al. Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(3): 664-672.
- [2] 李强, 门兴元, 景春, 等. 我国草地贪夜蛾应急防控研究进展[J]. 植物保护, 2021, 47(6): 21-27.
- [3] 吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 1-5.
- [4] 姜玉英, 刘杰, 吴秋琳, 等. 我国草地贪夜蛾冬繁区和越冬区调查[J]. 植物保护, 2021, 47(1): 212-217.
- [5] 谢明惠, 钟永志, 陈浩梁, 等. 草地贪夜蛾在安徽地区越冬能力初探[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 236-241.
- [6] 常向前, 吕亮, 万鹏, 等. 草地贪夜蛾在湖北的越冬研究初探[J]. 植物保护, 2022, 48(1): 116-120.
- [7] SJURSEN H, SOMME L. Seasonal changes in tolerance to cold and desiccation in *Phauloppia* sp. (Acari, Oribatida) from Finse, Norway[J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46(10): 1387-1396.
- [8] RUIYAN M, SHUGUANG H, JING T, et al. Seasonal variation in cold-hardiness of the Japanese pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). [J]. Environmental Entomology, 2006, 35(4): 881-886.
- [9] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价方法[J]. 昆虫知识, 2004 (1): 7-10.
- [10] 陈丽芳, 邵东华, 段景攀, 等. 温度对昆虫的影响[J]. 内蒙古林业科技, 2015, 41(2): 57-61.
- [11] 张旺和, 徐进, 李伟, 等. 热激蛋白在昆虫生殖中的功能及作用机制[J]. 生物安全学报, 2023, 32(2): 109-117.

- [12] 田彩红, 黄建荣, 王亚楠, 等. 草地贪夜蛾成虫触角感器的超微结构观察[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 216–221.
- [13] POWELL S J, BALE J S. Cold shock injury and ecological costs of rapid cold hardening in the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Journal of Insect Physiology, 2004, 50(4): 277–284.
- [14] 周吕. 草地贪夜蛾 *Hsp70* 和 *Hsp90* 基因的克隆及对不同环境胁迫的响应[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022. DOI: 10.27047/d.cnki.ggudu.2022.001456.
- [15] ZHOU L, MENG J Y, RUAN H Y, et al. Expression stability of candidate RT-qPCR housekeeping genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Archives of insect biochemistry and physiology, 2021, 108(1): e21831–e21831.
- [16] 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[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [17] 田彩红, 刘晓光, 黄建荣, 等. 二点委夜蛾非典型嗅觉受体 *AlepOrco* 的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备[J]. 昆虫学报, 2020, 63(6): 667–678. DOI: 10.16380/j.kcxb.2020.06.002.
- [18] 罗举, 俞俊杰, 周明好, 等. 草地贪夜蛾过冷却点和结冰点的测定[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(3): 428–432.
- [19] 牛浩, 兰珍珍, 牛通, 等. 草地贪夜蛾室内种群过冷却点和结冰点的测定[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 2022, 43(4): 387–390.
- [20] 张智, 郑乔, 张云慧, 等. 草地贪夜蛾室内种群抗寒能力测定[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 43–49.
- [21] ASSA, BCGA. A review of insect cold hardiness and its potential in stored product insect control[J]. Crop Protection, 2017, 91: 93–99.
- [22] 张同强, 张蕾, 程云霞, 等. 草地贪夜蛾耐低温能力研究[J]. 植物保护, 2021, 47(1): 176–181.
- [23] FOSTER R E, CHERRY R H. Survival of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to cold temperature[J]. Florida Entomologist, 1987, 70(4): 419–422.
- [24] 邱良妙, 刘其全, 田新湖, 等. 福建省草地贪夜蛾种群的耐寒性与越冬能力研究[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(6): 1299–1310.
- [25] WATERS ER. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2): 391–403.
- [26] 郑海霞, 张天浩, 张敏, 等. 高温胁迫下绿豆象内参基因筛选及其 *Hsp70* 基因的表达特性[J]. 植物保护学报, 2022, 49(3): 799–808.
- [27] 郑海霞, 高玉林, 张方梅, 等. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-hsp70* 的克隆及温度胁迫下的表达特性[J]. 中国农业科学, 2021, 54(6): 1163–1175.
- [28] 陈静, 张道伟, 余亚娅, 等. 褐飞虱 *HSP70* 与 *HSP90* 基因特性及温度诱导表达[J]. 生物技术, 2018, 28(5): 434–440.
- [29] 王德钢, 贺鹏鹏, 马光皇, 等. 低温胁迫下香梨优斑螟内参筛选及 *HSP70*、*HSP90* 基因表达分析[J]. 西南农业学报, 2020, 33(11): 2503–2508.
- [30] 程佳旭, 付步礼, 李传仁, 等. 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[J]. 应用昆虫学报, 2021, 58(3): 632–642.
- [31] 谭瑶, 张玉, 霍志家, 等. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp70* 的克隆与表达模式分析[J]. 昆虫学报, 2017, 60(8): 865–875.
- [32] SONODA S, ASHFAQ M, TSUMUKI H. 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[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2006, 62(2): 80–90.
- [33] 王宪辉, 齐宪磊, 康乐. 昆虫的快速冷驯化现象及其生态适应意义[J]. 自然科学进展, 2003(11): 10–15.
- [34] 张起恺, 邢振龙, 吴圣勇, 等. 三叶斑潜蝇对冷驯化的响应及不同种群耐寒性差异[J]. 中国农业科学, 2021, 54(13): 2781–2788.
- [35] 孔维娜, 王怡, 郭永福, 等. 梨小食心虫过冷却点及结冰点测定[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 102–105.
- [36] 邵钰莹, 冯宇倩, 田斌, 等. 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫过冷却点及主要耐寒物质的影响[J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(6): 961–970.
- [37] PEI Y, JIN J, WU Q, et al. Cold Acclimation and Supercooling Capacity of *Agasicles hygrophila* Adults[J]. Insects, 2023, 14(1): 58–58.
- [38] SEJERKILDE M, SORENSEN J G, LOESCHCKE V. Effects of cold-and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*[J]. Journal of Insect Physiology, 2003, 49(8): 719–726.
- [39] HUANG J R, LI G P, LEI H X, et al. Low-temperature derived temporal change in the vertical distribution of *Sesamia inferens* larvae in winter, with links to its latitudinal distribution[J]. Public Library of Science, 2020, 15(7): e0236174.
- [40] ZHAOKE D, YITONG H, YONGLIN R, et al. Seasonal and Year-Round Distributions of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and Its Risk to Temperate Fruits under Climate Change[J]. Insects, 2022, 13(6): 550–550.

Determination of discriminating temperatures for *Spodoptera frugiperda* and the response of *Hsp70* and *Hsp90* genes under low temperature stress

TIAN Caihong¹, ZHANG Junyi^{1,2}, DANG Jing³, HUANG Jianrong¹, YIN Xinming²,
LI Guoping¹, FENG Hongqiang¹

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences/ Henan Key Laboratory of Crop Pest Control/ Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southern Region of North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China/ international Joint Research Laboratory for Crop Protection of Henan/Biological Pesticides Engineering Research Center of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002; 2. College of Plant Protection/ Henan International Laboratory for Green Pest Control, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002; 3. Yuzhou Science and Technology Bureau, Yuzhou, Xuchang, Henan 461670, China)

Abstract: Mortality rates of 1–6 instar larvae and pupae of *Spodoptera frugiperda* under low temperature conditions were measured in the laboratory to explore the cold resistance of the larvae and pupae of *S. frugiperda* (J. E. Smith). The linear regression equation was fitted and the discriminating temperatures at each developmental stage were calculated. The discriminating temperatures for 1–6 instar larvae and pupae were -7.80°C , -9.70°C , -9.61°C , -8.78°C , -8.29°C , -8.05°C and -9.51°C , respectively. The expression of *Hsp70* gene (GenBank accession number: NC_064223.1) and *Hsp90* gene (GenBank accession number: MN832694) of *S. frugiperda* reared at room temperature and treated at low temperature was analyzed by using quantitative real-time PCR. The results showed that the expression levels of *Hsp70* gene and *Hsp90* gene of *S. frugiperda* reared at room temperature and treated at low temperature were different at different developmental stages. After low temperature treatment, the expression level of *Hsp70* gene in the first instar larvae was significantly reduced ($P < 0.05$), while the expression levels in 2nd – 6th instar larvae and pupae were significantly increased ($P < 0.01$). The expression level of *Hsp90* gene in 1st–6th instar larvae was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression level in pupae was significantly decreased ($P < 0.01$).

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; cold recognition temperature; *Hsp70*; *Hsp90*; quantitative real-time PCR

(责任编辑:叶 静)