

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

B 型烟粉虱和温室粉虱热胁迫适应性及其分子
生态机制

**Adaptation of Two Whitefly Species, *Bemisia tabaci* (Gennadius)
B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)
(Homoptera: Aleyrodidae), to Thermal Stress: Temperature
Responses and Molecular Mechanisms**

博 士 研 究 生：崔旭红

指 导 教 师：万方浩研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：生物安全

研 究 方 向：生物入侵

培 养 单 位：植物保护研究所

研究生院

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D. Dissertation

**Adaptation of Two Whitefly Species, *Bemisia tabaci* (Gennadius)
B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)
(Homoptera: Aleyrodidae), to Thermal Stress: Temperature
Responses and Molecular Mechanisms**

Ph.D. Candidate: Xu-Hong Cui

Advisor: Prof. Fang-Hao Wan

Major: Biosafety

Speciality: Invasive Alien Species

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June, 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

基金项目及完成单位

本研究为国家重点基础研究发展计划“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”(973计划, 2002CB111403)的部分内容。所有实验在“中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室”以及“农业部外来生物入侵生物预防与控制研究中心”完成。

摘 要

B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) B-biotype 和温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood 都是我国重要的外来入侵害虫。两者虽为近缘种,但在生境适应过程中两者在种群优势关系上产生了地域和季节性分化:在适宜寄主资源充分的生境中,种群间优势关系不以入侵生境的时间先后决定;温室粉虱主要在北方危害,而 B 型烟粉虱无论在北方还是在南方,均大发生,在有些地区或寄主上有 B 型烟粉虱逐步取代温室粉虱的趋势;在两种粉虱种群混合发生的北方,夏季高温季节以 B 型烟粉虱种群为主,春秋两季气候趋凉时温室粉虱种群上升为优势种群。结合两者在我国的地理分布和种群动态差异,我们推测两者对温度,特别是极端温度的适应性差异是导致两种粉虱种群动态存在差异的一个重要原因。因此我们研究了两种粉虱对热胁迫的适应性以及 hsp70 在 B 型烟粉虱抵抗高温中的作用,以期能够解释这种现象。主要结果如下:

1. B 型烟粉虱和温室粉虱卵、伪蛹和成虫的存活率均随着温度升高和暴露时间的延长呈现出下降的趋势。在相同的处理条件下, B 型烟粉虱 3 个虫态的存活率均要高于温室粉虱。在 37-41℃ 范围内高温对 B 型烟粉虱成虫的存活率没有显著影响;当温度上升到 43℃ 和 45℃ 时,成虫的存活率要低于卵和伪蛹。经过高温暴露后,温室粉虱卵的存活率要高于其它 2 个虫态。

2. B 型烟粉虱和温室粉虱都是雌虫的耐热性高于雄虫。在相同的处理条件下, B 型烟粉虱雌虫的耐热性要高于温室粉虱;雄虫中也观察到相似的现象。

3.非致死高温驯化可以显著的提高 B 型烟粉虱成虫对极端高温的抵抗力,在 37℃ 驯化 30min, B 型烟粉虱成虫在 45℃ 下的存活率由 44.0% 上升到 63.9%;但高温驯化对温室粉虱成虫的耐热性没有显著提高。

4.短时高温暴露对 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的产卵前期没有显著影响,两种粉虱都是在 2 天左右开始产卵。短时高温暴露对 B 型烟粉虱成虫的产卵量没有显著影响;温室粉虱的产卵量随着暴露温度的升高迅速下降,在 43℃ 下暴露 1h 后仅有极少量的卵产出。两种粉虱成虫经过高温暴露后,产下的卵的孵化率和后代总的存活率均有所下降,温室粉虱成虫在 43℃ 下暴露 1h 后产下的卵不能孵化;而 B 型烟粉虱成虫经过 43℃ 和 45℃ 高温暴露后,仍有一部分个体能够完成世代发育。高温暴露对温室粉虱后代性比没有显著影响; B 型烟粉虱成虫经过 43℃ 和 45℃ 高温暴露后,其后代中雄虫比例显著增加。

5.分别克隆了具有分子伴侣功能的 B 型烟粉虱和温室粉虱的热激蛋白基因 hsp70 cDNA 片段,比对结果表明, hsp70 具有较高的保守性。

6.成功构建了 B 型烟粉虱 hsp70 表达实时荧光定量检测体系,并检测了温度变化对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响。结果表明,较缓和的高温对 B 型烟粉虱 hsp70 表达具有诱导作用,极端高温会抑制 hsp70 表达。在 37-41℃ 范围内, hsp70 的表达量随着温度的升高而升高,在 41℃ 时达到最高峰;当温度升高到 43℃ 和 45℃, B 型烟粉虱 hsp70 的表达量迅速降低。B 型烟粉虱温室种群体内的 hsp70 表达量与温室内的温度有关:上午到中午随着气温的升高, B 型烟粉虱体内 hsp70 表达量随之上升;傍晚气温降低时, hsp70 表达量也随之下降。

本研究揭示了两种粉虱对高温的适应性差异是导致两者在我国种群发生上存在季节性差异的一个重要原因; hsp70 在 B 型烟粉虱抵抗高温过程中可能具有重要作用,这对揭示 B 型烟粉虱

及其它入侵害虫的种群形成与扩张机制具有重要的科学价值,对 B 型烟粉虱的可持续控制具有重要的理论和实践意义。

关键词: B 型烟粉虱, 温室粉虱, 热胁迫, 热激蛋白基因

Abstract

Bemisia tabaci (Gennadius) B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* Westwood are both important invasive alien pests in China. These two sympatric whiteflies species diverged in regional population predominance in the process of habitat adaptation: population predominance is not decided by time order of their first invasion under condition that suitable host plants are available in their habitat; *B. tabaci* B-Biotype is tending to displace *T. vaporariorum* in many regions or on many host plants; *T. vaporariorum* causes extensive damage in the northern China, while *B. tabaci* B-Biotype explosive outbreak almost throughout the country from the south to north areas; population of *B. tabaci* B-Biotype is generally predominant in hot summer while *T. vaporariorum* toward the cool autumn or spring. So we hypothesize the adaptability of tolerance to thermal stress may be one of the important reasons that leads to two whitefly species interspecific differentiation in seasonal dynamics and distributions. The association between interspecific differentiation in thermal adaptation and the interspecific displacement was revealed in the level of biology and molecular biology. The main results of this study are as follows.

1. The survivals of three developmental stages of two whitefly species decreased with the increase of temperature and the prolonging of heating period. Further, the survival rates of eggs, red-eyed nymphs and adults of *B. tabaci* B-biotype were higher than those of *T. vaporariorum*. There were significant differences when heat tolerance between these two whitefly species was compared. The survival rates of *B. tabaci* B-biotype adults were not significantly affected by the temperature varied from 37 to 41 °C, however, the adult had the weakest tolerant ability to extremely high temperature, 43 and 45 °C. In the case of *T. vaporariorum*, the egg had the highest heat tolerance among the three tested stages.

2. In both whitefly species, the decreased survival due to the brief exposure of high temperature represented significant difference between female and male adults and females appeared higher survival than that of males. In addition, B-Biotype *B. tabaci* female adults had higher survival than that of *T. vaporariorum* at the same conditions. The similar phenomenon was also observed in male adults of two whitefly species.

3. Acclimation at non-lethal high temperature significantly influenced heat tolerance of *B. tabaci* B-biotype, which can enhance its survival as high as 63.9% at 45 °C. However, heat tolerance of *T. vaporariorum* adults were not significantly enhanced after acclimation at 37 °C.

4. Shorter period of exposure to high temperature had no influence on pre-oviposition period of two whitefly species and female adults began to lay eggs around 2 days. The female fecundities were not significantly different when *B. tabaci* biotype B adults were exposed to all temperatures. In contrast, the fecundities of *T. vaporariorum* declined with the increase of temperature, and only a few eggs were oviposited at 43 °C. Survivals or hatch rates of the F1 nymphs of both whitefly species declined as the increase of temperature, and no *T. vaporariorum* nymphs were hatched at 43 °C. Similarly, percentages

of F1 offspring developed to adults for both whitefly species also declined as the increase of temperature. Sex ratios of the F1 offspring were not significantly affected for *T. vaporariorum* but were slightly affected for *B. tabaci* biotype B at the heat shock temperatures, 43 and 45°C.

5. Heat shock protein 70 (hsp70) gene functioned as molecular chaperones was cloned, with a result of 3 partial cDNA sequences for *B. tabaci* biotype B and 2 partial cDNA sequences for *T. vaporariorum*. This showed that hsp70 gene family is evolutionarily conservative.

6. The plasmid with hsp70 cDNA of *B. tabaci* B-biotype adults was used as a template. Based on GenBank, one TaqMan-MGB probe and the corresponding primers were designed to construct a series of standards for real-time fluorescence quantitative Real-time-PCR to detect the expression of hsp70 gene of adults *B. tabaci* B-biotype. High temperature can induce the expression of hsp70 gene in *B. tabaci* B-biotype adults. Within the range of 37 to 41°C, the expression level of hsp70 gene of B-Biotype *B. tabaci* adults rised with the increase of temperature. However, when temperature increased to 43°C and 45°C, the hsp70 gene expression level decreased sharply. The hsp70 gene expression level of *B. tabaci* B-biotype adults were changed in response to the diurnal temperature change. When air temperature increased from 34°C to 41°C, the hsp70 gene expression level increased dramatically. And the hsp70 gene expression level decreased when air temperature decreased to 33°C at nightfall.

Our research indicated that the differences of thermal stress tolerance between *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum* was one of the main reasons that lead to the interspecific differentiation of geographic variation in distribution and seasonal dynamics. The molecular mechanism of *B. tabaci* B-biotype adaptation to thermal stress was revealed. The significance of heat tolerance was elucidated in insect evolutionary adaptation and distribution. The results also have theoretical and practical significance in explaining the population expanding mechanisms of biological invasion and prediction of population dynamics.

Key words: *Bemisia tabaci* B-biotype, *Trialeurodes vaporariorum*, thermal stress, heat shock protein gene

目 录

第一章 绪论	1
1.1 我国生物入侵的现状及其存在的问题	1
1.2 B 型烟粉虱和温室粉虱研究概况	2
1.2.1 B 型烟粉虱和温室粉虱起源、分布和危害	2
1.2.2 B 型烟粉虱和温室粉虱的生境适应特点	4
1.2.3 B 型烟粉虱和温室粉虱竞争取代和种群发生的时空分化	5
1.3 昆虫热胁迫适应性研究进展	6
1.3.1 昆虫耐热性的研究方法	6
1.3.2 昆虫对高温的反应	7
1.3.3 高温对昆虫造成伤害原因	7
1.3.4 影响昆虫耐热性的因素和一般规律	8
1.3.5 昆虫耐热性机制	9
1.4 热激蛋白研究进展	10
1.4.1 热激蛋白的分类与特性	10
1.4.2 热激蛋白的诱导因子	11
1.4.3 热激蛋白的主要功能	11
1.4.5 热激蛋白基因及其表达调控	13
1.4.6 热激蛋白与生物环境适应及进化的关系	13
1.5 本文的总体研究思路、主要内容和路线	15
第二章 B 型烟粉虱和温室粉虱耐热性研究	17
2.1 材料与方法	17
2.1.1 供试昆虫和寄主植物	17
2.1.2 热胁迫对两种粉虱不同虫态存活的影响	17
2.1.3 两种粉虱不同性别成虫耐热性研究	18
2.1.4 高温驯化对两种粉虱耐热性的影响	18
2.2 数据处理	18
2.3 结果与分析	18
2.3.1 高温胁迫对两种粉虱卵孵化的影响	18
2.3.2 高温对两种粉虱伪蛹羽化的影响	20
2.3.3 高温对两种粉虱成虫存活的影响	21
2.3.4 两种粉虱不同虫态耐热性比较	21
2.3.5 两种粉虱不同性别成虫耐热性研究	22
2.3.6 高温驯化对两种粉虱耐热性的影响	24
2.4 小结与讨论	24
第三章 B 型烟粉虱和温室粉虱热胁迫生殖适应性研究	26

3.1 材料与方法.....	26
3.1.1 供试昆虫和寄主植物	26
3.1.2 热胁迫处理方法和饲养条件.....	26
3.1.3 热胁迫对 B 型烟粉虱和温室粉虱生殖适应性的影响	26
3.2 数据处理	27
3.3 结果与分析.....	27
3.3.1 热胁迫对两种粉虱成虫寿命的影响.....	27
3.3.2 热胁迫对两种粉虱成虫产卵前期和产卵量的影响.....	28
3.3.3 热胁迫对两种粉虱后代生存能力的影响.....	29
3.4 小结与讨论.....	32
第四章 B 型烟粉虱和温室粉虱热激蛋白基因 hsp70 cDNA 片段克隆.....	34
4.1 材料和方法.....	34
4.1.1 供试昆虫	34
4.1.2 主要仪器设备	34
4.1.3 粉虱成虫总 RNA 的提取	34
4.1.4 反转录合成第一链 cDNA	35
4.1.5 引物设计	36
4.1.6 粉虱 hsp70 cDNA 片段 RT-PCR 扩增.....	36
4.1.7 PCR 产物回收纯化.....	37
4.1.8 hsp70 cDNA 片段克隆.....	37
4.2 结果与分析.....	38
4.2.1 两种粉虱成虫总 RNA 的提取和方法优化	38
4.2.2 RT-PCR 扩增 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段	39
4.2.3 RT-PCR 粉虱扩增温室粉虱 hsp70 cDNA 片段.....	39
4.2.4 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列	40
4.2.5 B 型烟粉虱和其它不同物种 hsp70 cDNA 序列同源性比较	44
4.2.6 温室粉虱 hsp70 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列.....	50
4.2.7 温室粉虱和其它不同物种 hsp70 cDNA 序列同源性比较.....	50
4.3 小结与讨论.....	55
第五章 B 型烟粉虱热激蛋白 hsp70 表达与耐热性调控.....	57
5.1 材料与方法.....	57
5.1.1 实验材料	57
5.1.2 总 RNA 提取与检测	57
5.1.3.反转录合成第一链 cDNA	57
5.1.4 引物、探针设计与合成.....	58
5.1.5 标准曲线样品的制备与实时荧光定量检测.....	58
5.1.6 B 型烟粉虱 hsp70 表达的定量检测	59
5.2 数据分析	59

5.3 结果与分析.....	60
5.3.1 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段 RT-PCR 扩增.....	60
5.3.2 重组质粒的鉴定和测序.....	60
5.3.3 标准曲线样品的制备与实时荧光定量检测.....	60
5.3.4 高温胁迫对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响	61
5.3.5 气温变化对 B 型烟粉虱成虫 hsp70 表达的影响.....	62
5.4 小结与讨论.....	63
第六章 结论与展望	65
6.1 结论	65
6.2 展望	66
6.3 本研究的创新点.....	66
参考文献.....	68
致谢.....	87
个人简历.....	88

图表目录

图 2-1 B 型烟粉虱和温室粉虱卵经过高温暴露后孵化率	19
图 2-2 B 型烟粉虱和温室粉虱伪蛹经过高温暴露后存活率	20
图 2-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经过高温暴露后存活率	22
图 2-4 B 型烟粉虱和温室粉虱不同性别成虫经过高温暴露后存活率	23
图 2-5 非致死高温驯化对 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫耐热性的影响	24
图 3-1 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫高温暴露后平均每雌虫一生产卵量	29
图 3-2 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代的卵孵化率	31
图 3-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代总存活率	31
图 3-4 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代雌虫所占比例	32
图 4-1 B 型烟粉虱总 RNA	39
图 4-6 B 型烟粉虱不同 hsp70 部分核苷酸序列的比对	46
图 4-7 B 型烟粉虱及其它昆虫 hsp70 核苷酸序列同源性比较	47
图 4-8 B 型烟粉虱和其它昆虫 HSP70 部分氨基酸序列的比对	48
图 4-9 B 型烟粉虱与昆虫组成型 HSC70 和胁迫诱导型 HSP70 蛋白同源性分析	49
图 4-10 温室粉虱及其它昆虫 hsp70 核苷酸序列同源性比较	51
图 4-11 温室粉虱 HSP70 氨基酸序列和其它昆虫 HSP70 部分氨基酸序列比对。	54
图 4-12 温室粉虱与昆虫组成型 HSC70 和胁迫诱导型 HSP70 蛋白同源性分析	55
图 5-1B 型烟粉虱 hsp70 cDNA RT-PCR 扩增结果	60
图 5-2 重组质粒 PCR 鉴定	60
表 1-1 诱导热激蛋白表达的生态相关因子	12
表 3-1 热胁迫后 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的寿命	28
表 3-2 热胁迫后 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的产卵前期	29
表 3-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经过高温暴露后后代存活率与温度之间的回归分析	30
表 5-1 高温暴露后 B 型烟粉虱 hsp70 表达的实时荧光定量 PCR 检测	62
表 5-2 气温变化对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响	62

第一章 绪论

1.1 我国生物入侵的现状及其存在的问题

生物入侵(Biological invasion, or bioinvasion)是指生物由原生存地经自然或人为的途径侵入到另一个新环境,对入侵地的生物多样性、农林牧渔业生产以及人类健康造成经济损失或生态灾难的过程(万方浩等, 2002a)。生物入侵不仅能彻底改变生态系统的结构和功能,而且还会严重影响社会和人类健康,造成重大的经济损失(OTA, 1993; White, 1997; 康乐, 1999; Pimental et al., 2000)。随着全球经济一体化进程的加快,生物入侵的现象越来越普遍,目前已成为当今世界最棘手的三大环境难题(生物入侵、动植物栖息地丧失和全球变化)之一(董志峰, 2001)。

我国是全球受外来生物入侵影响最大的国家之一。据初步统计,目前入侵我国的外来物种至少有 400 多种(万方浩等, 2005)。在世界自然保护联盟(IUCN)公布的全球 100 种最具威胁的外来物种中,我国就有 50 种(万方浩等, 2005)。而且我国外来生物入侵的范围非常广泛,除了青藏高原上人迹罕至的偏远保护区外,全国 34 个省、市、自治区均不同程度地受到外来入侵物种的影响和威胁(杨期和等, 2002)。生物入侵的影响和危害还几乎涉及到所有生态系统和物种类型,如森林、农业区、水域、湿地、草地、城市区等生态系统无一幸免;从脊椎动物、无脊椎动物、高低等植物、细菌、病毒等均能找到例证(李振宇和解焱, 2002; 蔡蕾等, 2003; 万方浩等, 2005)。

目前严重危害我国农林业的外来入侵动物大约有 40 多种(万方浩等, 2005),如烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)、美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury)、松突圆蚧 *Hemiberlesia pitysophila* Takagi、湿地松粉蚧 *Oracella acuta* (Lobdell) Ferris、美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* (Blanchard)、南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard)、稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel、苹果棉蚜 *Eriosoma lanigerum* (Hausmann)、非洲大蜗牛 *Achatina fulica* Ferussac、松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner)、福寿螺 *Ampullaria gigas* Spix 等。这些外来入侵种不仅造成作物减产、林木受损,影响农林畜牧渔业的生存和发展,还在检疫、控制和消灭过程中导致各种直接或间接的经济损失。例如,被称为“松树癌症”的松材线虫目前在我国已蔓延到 63 县(市),累计枯死松树 2,000 万株(刘世骥, 2001)。1998 年美国要求我国对所有出口美国的木包装材料实施严格的检疫处理,仅此一项,就直接影响我国对美贸易出口量的 1/3-1/2,造成的损失达 170 亿美元(万方浩等, 2005)。美洲斑潜蝇 1993 年最早在海南发现,目前已经广泛分布于我国 29 个省、市、自治区,每年防治此虫的费用超过 4.5 亿元。据粗略统计,入侵种每年给我国造成的经济损失高达数千亿元人民币,其中,部分主要入侵种每年给我国农林业造成的经济损失就高达 574 亿元人民币(万方浩, 2002b)。此外,在控制外来入侵种过程中所使用的杀虫剂和除草剂对生态系统、环境和人类健康的影响更是难以估计的。

虽然人类采取了多种措施和方法来预防和控制生物入侵,但是随着全球经济一体化,贸易和人类交往越来越频繁,物种的传播获得了前所未有的机会,外来种数量迅速上升,生物成功入侵的机率也大大增加(Ruesink, 1995)。例如,在 20 世纪 90 年代以前,我国每 8-10 年发现 1 种入侵生物,而 90 年代以后,每年都会新发现 1-2 种入侵生物。研究调查也表明,大部分的生物入侵是通过人类活动、货物运输等有意或无意侵入异地的(陈兵和康乐, 2003; 徐海根等, 2004)。

如徐海根等(2004)对我国 283 种外来入侵种的分布与传入路径进行分析发现, 39.6 %属于有意引进, 49.3 %属无意引进; 经自然扩散而进入中国境内的外来入侵物种有 9 种, 仅占 3.1%。

对大量的文献资料进行整理分析发现, 入侵我国主要的农林外来节肢动物、植物和病原微生物, 美洲起源的物种所占的比例最大, 表明美洲起源的物种较能适应中国的生境, 成为中国外来入侵种的可能性最大。因此, 在以后的植物检疫中, 要特别注意来自美洲的动物、植物、货物、土壤、包装物和交通工具等, 以免携带外来物种, 入侵我国的生态系统(郭建英等, 2005)

对于生物入侵, 要完全杜绝几乎是不可能的(Mack, et al., 2000)。而外来生物一旦入侵成功, 要彻底根除是极为困难的; 用于控制其危害、扩散蔓延的防治代价极大, 费用极为昂贵。因此, 加强入侵前的预防比入侵后的控制将会更有效、代价会更小(Kaiser, 1999)。在我国人为因素是导致部分主要外来种入侵的重要原因, 如: 缺乏科学的外来生物的风险-收益评价体系和严格的科学决策程序(如大米草的引进)、盲目引进(如作为猪饲料引进的空心莲子草、水葫芦)、淡薄的生态意识与不顾生态后果的经济利益驱使(如福寿螺、褐云玛瑙螺的养殖与随地遗弃)、有法不依与执法不严(如湿地松粉蚧的人为传入)等(万方浩等, 2002a)。因此, 从生态安全的角度, 加强和完善外来入侵生物的预防和管理体系与机制非常必要。对于已经入侵我国并建立稳定种群的重要危害种, 需要有针对性地加强其入侵路径和生态适应机理的研究, 弄清影响其种群形成与扩张的关键因素以及暴发成灾的机制, 从而为该种群的控制提供科学可行的指导原则。

1.2 B 型烟粉虱和温室粉虱研究概况

1.2.1 B 型烟粉虱和温室粉虱起源、分布和危害

粉虱属于同翅目粉虱科(Homoptera: Aleyrodidae), 是一类体型微小的植食性刺吸类害虫, 广泛分布于世界各大动物区, 主要集中在热带和亚热带地区(Mound and Halsey, 1978)。全世界有记载的粉虱已经达到了 1420 种, 但从世界范围来看, 目前报道最多, 危害也最为严重的是烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)和温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood(阎凤鸣和李大建, 2000; 柯俊成等, 2002; EPPO, 2004)。

烟粉虱首次报道于 1889 年, 在希腊的烟草上发现并被命名为烟粉虱 *Aleyrodes tabaci* (Gennadius, 1889)。由于烟粉虱的形态变异较大, 它曾产生过许多异名, 如棉粉虱、甘薯粉虱、一品红粉虱等(Russell, 1957; 柯俊成等, 2002)。虽然烟粉虱最早的报道在希腊, 但目前关于烟粉虱的真正起源还不确定。根据粉虱科中小粉虱分类的进化联系表明烟粉虱可能起源于热带非洲, 然后在近期传入新热带区和南美(Mound, 1963; Cock, 1986; Campbell et al., 1996)。但也有些证据表明烟粉虱可能起源于印度和巴基斯坦, 因为在那烟粉虱寄生蜂种类最为丰富, 应当属于起源中心(Brown et al., 1995)。

20 世纪 80 年代以前烟粉虱主要在苏丹、埃及、印度、巴西、伊朗等一些产棉国的棉花上造成一定损失(罗晨和张芝利, 2000)。但到了 20 世纪 80 年代以后, 烟粉虱在美国等世界多个国家相继暴发, 成为危害棉花、蔬菜和花卉等经济作物的重要害虫(Schuster et al., 1990; Brown, 1994)。通过生物学、酯酶鉴定等手段证实这些烟粉虱为一种新的生物型即 B 型烟粉虱(Costa and Brown, 1991)。随后, 世界各国对烟粉虱的生物型以及系统发育进行了深入的研究, 结果表明烟粉虱是由许多生物型组成的能够快速进化的复合种(Guirao et al., 1997; De Barro et al., 1998, 2000;

Quintero et al., 1998; De Barro and Hart, 2000; Lima et al., 2000; Banks et al., 2001; Perring, 2001; Delatte et al., 2005)。目前已经确定烟粉虱至少有 26 个生物型, 如 A 型、B 型、E 型、Q 型、J 型、木薯型、非木薯型、秋葵型、Sida 型等。其中 A、B 型烟粉虱较常见, 几乎全世界均有分布, 其它生物型均为区域性分布(Perring, 2001; Delatte et al., 2005)。在烟粉虱的各种生物型中, 由于 B 型烟粉虱取食量大, 寄主范围广, 存活力强, 产卵量大, 发育快, 更易产生抗药性, 传播病毒广泛, 危害最为严重(Yokomi et al., 1990; Perring et al., 1993a,b)。自 1985 年烟粉虱大发生以来, B 型烟粉虱一直是研究的焦点。

在过去近 20 年间, B 型烟粉虱已经迅速传播扩散到世界各地并暴发成灾, 成为一种世界性重要害虫(Oliveiraa et al., 2001)。美国的研究表明, B 型烟粉虱在 20 世纪 80 年代侵入该国后, 使佛罗里达中南部的一品红生产遭受到了严重打击, 并随后扩展到了蔬菜作物。1991 年加利福尼亚 Imperia Valley 的作物几乎被烟粉虱摧毁至绝收(Toscano et al., 1998)。1991 年至 1992 年烟粉虱在亚利桑那、加利福尼亚、德克萨斯和佛罗里达等州大暴发, 分别造成了 2 亿和 5 亿美元的损失(Oliveiraa et al., 2001)。在 1994—1998 年, 亚利桑那、加利福尼亚、德克萨斯州的棉农用于防治该虫危害的费用就达 1.593 亿美元, B 型烟粉虱成为美国中南部地区露地蔬菜、棉花和北部温室蔬菜、花卉中的主要害虫(Oliveiraa et al., 2001)。不过近年来, B 型烟粉虱在美国的猖獗程度有所下降(Ellsworth and Jose, 2001)。在墨西哥 Sonora, 由于烟粉虱危害, 棉花种植面积减少了 65%(Silva, 1997)。在古巴、巴贝多、多明尼加共和国、萨尔瓦多、海地、洪都拉斯、危地马拉、牙买加、尼加拉瓜, 多种作物如番茄、秋葵、棉花、烟草和香瓜等由于烟粉虱的危害而遭受了严重的经济损失(Oliveiraa et al., 2001)。在洪都拉斯, 烟粉虱在香瓜、番茄和辣椒上的控制费用增加了 30%—50%(Oliveiraa et al., 2001)。在意大利和法国南部, 烟粉虱严重危害一品红和番茄。在俄罗斯、阿赛拜疆以及高加索地区的黑海海岸发现烟粉虱在温室里危害柑橘属的植物(Dantsing and Shenderovska, 1988; Traboulsi, 1994)。

欧洲在 1856 年就有温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*(Westwood) 危害作物的记载; 1870 年在北美首次作为温室害虫加以报道。一般认为, 温室粉虱起源于南美巴西和墨西哥一带, 后经寄主植物传入美国和加拿大, 在由此传入欧洲, 到 20 世纪 60 年代, 温室粉虱传入亚洲, 目前此虫在世界范围内广泛分布(Russell, 1948, 1963; Dennis, 1987)。

温室粉虱和烟粉虱是先后传入我国的外来种。温室粉虱何时传入我国没有定论。20 世纪 40 年代末到 60 年代初, 北京和天津等地曾采集到温室粉虱, 70 年代此虫迅速扩展到内蒙古一带, 1976 年在北京大暴发, 90 年代在新疆、兰州等地已造成严重危害。现在温室粉虱在我国 22 个省市地区均有分布, 在我国东北、华北和西北各省普遍发生(王子清, 1979; 王印来, 1981; 马文斌等, 1999)。我国早在 1949 年就有烟粉虱的相关记载(周尧, 1949), 但是长期以来烟粉虱在我国并不是主要害虫, 仅在我国台湾、云南、海南和上海(李凤荪, 1953; 罗志义等, 1989)等地有危害棉花的记录。到了 20 世纪 90 年代后期, 烟粉虱在我国南北部分地区大暴发, 造成了严重危害(张芝利, 2000)。据调查, 在北京, 烟粉虱对黄瓜、番茄、茄子、甜瓜和西葫芦危害造成的损失, 严重时可达 7 成以上(罗晨和张芝利, 2000; 罗晨等, 2000)。2000 年我国新疆棉区的棉花受烟粉虱危害, 纤维严重受损; 山西运城的萝卜由于烟粉虱的危害减产 40% 左右(张慧杰等, 2002)。通过研究鉴定, 目前我国暴发的烟粉虱为 B 型烟粉虱(胡敦孝和吴杏霞, 2001; 罗晨, 2002; 褚栋等, 2005)。此虫自从 20 世纪 90 年代中后期成功入侵我国后扩散非常迅速, 根据近几年的调

查结果表明,除了浙江(臧连生, 2004)、福建(罗晨, 2002; Wu et al., 2003)、广西(吴杏霞, 2002; Wu et al., 2003)、广东、湖南、湖北、山西(邱宝利等, 2003)、台湾(De Barro et al., 1998)、海南(De Barro et al., 2000)等地还有零星非B型烟粉虱发生外,其他大部分省市和地区都不同程度的受到B型烟粉虱的危害(赵莉等, 2000; 张慧杰等, 2002)。

1.2.2 B 型烟粉虱和温室粉虱的生境适应特点

B型烟粉虱和温室粉虱的形态、危害特征及生活史相似(Liu et al., 1994; 胡敦孝和吴杏霞, 2001; EPPO, 2004)。两者的生活周期均可分为卵、3个若虫期、伪蛹和成虫4个时期,通常人们将第4龄若虫称伪蛹(Martin, 1999)。粉虱的成虫一般将卵产在植物叶片背面。一龄若虫孵化后在叶背爬行,寻找合适的取食场所,数小时后即固定刺吸取食,直到成虫羽化(Martin, 1999)。粉虱成虫可以在植株内或植株间作短距离扩散,也可借风或气流作长距离迁移(van Lenteren and Noldus, 1990)。目前,贸易往来发展迅速,B型烟粉虱卵和若虫借助花卉及其他经济作物苗木(如一品红)的调运可以实现跨地区、跨国迅速传播。

B型烟粉虱入侵的一个明显特点是传播扩散速度非常快,且不受季节地域限制,这与花卉产业全球化以及寒冷地区温室大棚和保护地的迅速发展有关。美国学者在加勒比海的调查表明,B型烟粉虱主要通过引进观赏植物传入,然后从观赏植物上扩散到蔬菜及城郊其他观赏植物上(Brown et al., 1995)。在多米尼亚和波多黎各的调查表明,B型烟粉虱于1987-1988年通过一品红及其生产设备传入这两个国家,然后通过观赏植物传播到各地,而在每个地区,B型烟粉虱则在温室观赏植物、番茄的幼苗传播开来,然后再传播到四周的豆类、木薯、棉花、瓜类、辣椒、烟草等作物上。在美国,1988-1989年在亚利桑那、加利福尼亚、佛罗里达、德克萨斯4个州发现B型烟粉虱的零星危害,到1990-1991年就已经普遍发生。到1993年,中美、南美国家都已经报道烟粉虱大发生(Brown et al., 1995)。在我国,1996-1997年B型烟粉虱相继在广东珠海、东莞发生危害,随后在广东多个地区(黄埔区、天河区、白云区及花都、增城、番禺、东莞、南海、斗门等)严重发生。2000年,烟粉虱在北京地区造成严重危害,黄瓜每单叶上的粉虱成虫可达250-300头(张芝利, 2000)。2001年,烟粉虱在海南、江苏、安徽等地大发生,造成严重减产(刘立云, 2002; 周福才等, 2003)。2002-2003年B型烟粉虱在山东部分地区严重暴发,危害的作物多达20多种,部分大豆田甚至因其危害而绝收。目前B型烟粉虱在我国20多个省市地区发生,危害逐年加重,其自然种群从南向北扩张迅速。根据研究推测,B型烟粉虱极有可能由国外的一品红引入到我国多个地区,随花木调运在我国不同地区相互传播,从花木上扩散到周围的农业、园艺业生产区,并暴发成灾。这种传播和扩散的途径与传播方式与美国等地所观测到的一致(Brown et al., 1995; 臧连生, 2005)。

烟粉虱和温室粉虱具有两性生殖和孤雌生殖两种生殖方式。通常情况下,成虫通过交配产下的受精卵发育成雌虫;而未交配或是未能成功交配受精的雌虫产下的未受精卵发育成雄虫(Martin, 1999)。这两种粉虱的繁殖力都很高。烟粉虱在棉花上平均每头雌虫可产卵48-394粒(Azab et al., 1971)。温室粉虱在适宜的条件下每雌虫一生可产150-300粒卵(Martin, 1999)。

烟粉虱和温室粉虱没有滞育和冬眠现象,在合适的环境条件下可以终年繁殖。烟粉虱在热带和亚热带地区一年可发生11-15代(Byrne and Bellows, 1991; Brown et al., 1995);温室粉虱在合

适的条件下 1 年也可完成 10 余代（向玉勇等，2004）。短暂的生活史对种群的延续具有重大的意义。烟粉虱和温室粉虱世代重叠现象严重，在同一时期同株寄主植物上通常可以见到各种虫态。粉虱各种虫态对农药的敏感性不同，当各种虫态混合发生时，防治十分困难。而且粉虱虫体小，在入侵和为害早期不易被察觉，所以容易暴发成灾。

具有非常广谱的寄主范围是这两种粉虱与异地栖境相适宜的另一个特点。B 型烟粉虱和温室粉虱的杂食性特征世界公认，根据记载 B 型烟粉虱寄主植物超过了 600 种，主要属于蝶形花科 Fabaceae、菊科 Asteraceae、锦葵科 Malvaceae、茄科 Solanaceae、大戟科 Euphorbiaceae、十字花科 Cruciferae 和葫芦科 Cucurbitaceae 等，新的寄主植物还在不断地发现当中（Mound and Halsey, 1978; Secker et al., 1998; Lima et al., 2000; Oliveiraa et al., 2001）。温室粉虱寄主植物也十分广泛，有 121 科、898 种，主要蔬菜有黄瓜、南瓜、冬瓜、西葫芦、芸豆、架豆、番茄、茄子、莴苣、辣椒等；观赏植物有倒挂金钟、夜来香、洋金枣、杜鹃、牡丹、天竺葵、绣球、月季、菊花、向日葵等（李祖荫等，1980；翁祖信等，1994）。大量栽培和非栽培的一年生或多年生植物都是外来粉虱取食和/或产卵的适宜寄主（Butler and Henneberry, 1986; Bedford et al., 1992, 1994; Brown et al., 1992, 1995）。

环境条件，包括温度、相对湿度（Relative humidity, RH）对烟粉虱和温室粉虱的生活史都有明显影响（Butler et al., 1983; Wagner, 1995; Tsueda and Koji, 1998; Muniz and Gloria, 2001）。烟粉虱各虫态发育历期随着温度的升高而递减（Butler et al., 1983; Tsueda and Koji, 1998）。在 15℃ 到 30℃ 的范围内，烟粉虱在茄子上卵的历期从 25.8 天下降到 4.2 天，若虫期从 79.1 天下降到 9.4 天，在 15℃ 和 30℃ 完成一代发育所需要的时间分别为 105 天和 13.6 天（Wang and Tsai, 1996）。相似的结果在棉花、一品红等寄主植物上也有报道（Butler et al., 1983）。烟粉虱雌虫的寿命从 20℃ 时的 44.36 天下降到 35℃ 时的 10.43 天（Drost et al., 1998）。相对湿度对烟粉虱的发育历期也有一定影响，在 25℃ 下，烟粉虱平均世代历期在 50%RH 下长达 43.6 天，但在 30%RH 下仅为 26.4 天，低湿干燥的环境有利于其种群的发生（陈夜江等，2001）。温室粉虱最适温度范围为 20-25℃，各虫态在低于 8℃，高于 35℃ 的情况下停止发育，成虫在低于 7℃ 下停止产卵（Martin, 1999）；在 15℃ 完成一代所需要的时间为 57 天，在 30℃ 仅要 18 天，30℃ 以上的高温对温室粉虱发育不利。温度对温室粉虱的产卵量影响显著，在 18℃ 时平均每雌一生可以产卵 300 粒，而在 30℃ 时产卵量少于 30 粒。75-80%RH 为温室粉虱发育的适宜范围。烟粉虱和温室粉虱相比，两种粉虱对温度的适应范围有一定的差异。烟粉虱在 27-28℃，成虫的寿命、产卵量均要高于温室粉虱；而在 21-22℃ 的范围内，温室粉虱的寿命、产卵量要大大高于 B 型烟粉虱。在同一寄主植物一品红上饲养，20℃ 从卵到 50% 成虫羽化所需的时间，B 型烟粉虱为 49.0 天，温室粉虱为 35.1 天；在 25℃ 时，前者需要 23 天，后者需要 29.5 天（Fransen, 1994）。Tsueda and Koji（1998）研究发现，在 20℃ 和 30℃ 的条件下，B 型烟粉虱存活率（卵-成虫）分别为 79.0% 和 65.8%；温室粉虱的存活率分别为 66.7% 和 23.1%。说明 B 型烟粉虱对高温的适应能力要强于温室粉虱。

1.2.3 B 型烟粉虱和温室粉虱竞争取代和种群发生的时空分化

竞争取代是在昆虫和蜘蛛类节肢动物中频繁发生的一种现象，并且可以在多种尺度上发生。例如，越过广泛的地理区域，在多样的栖息地取代；在特定的小环境中或是特定的寄主植物上发

生物种取代；多化性昆虫可以在一个栖息地在特定的时间被一种优势竞争者取代，但是在同一栖息的其他季节这种物种仍旧持续发生等(Reitz and Trumble, 2002)。目前，在许多地区已经发现 B 型烟粉虱竞争并取代土著生物或已经定居的外来生物的现象。在美国，B 型烟粉虱在很短的时间内几乎已经完全取代了本地的 A 型烟粉虱(Bellows et al., 1994; Perring et al., 1993a,b)。1991-1992 年以前，在墨西哥西南部、哥斯达黎加、危地马拉和尼加拉瓜地区存在 A 型、类 A 型、C 型、D 型或者 G 型的烟粉虱(Costa et al., 1993)，然而到 1994 年 B 型烟粉虱已经绵延到了墨西哥东部和西部沿海地区以及委内瑞拉。1991 年 B 型烟粉虱传入巴西，2002 年调查表明 B 型烟粉虱已经广泛分布并且超过土著 A 型烟粉虱(Lima et al., 2002)。在哥伦比亚也发现了 B 型烟粉虱取代 A 型烟粉虱的现象(Quintero et al., 1998,2001)。在我国浙江等地区，发现 B 型烟粉虱正在逐渐取代原先危害并不严重的非 B 型烟粉虱(臧连生等, 2005)。

温室粉虱和 B 型烟粉虱是先后传入我国的入侵害虫。两者虽是近缘种，但在生境适应过程中种群优势关系上产生地域和季节分化：(1) 在适宜寄主资源充分的生境中，两者种群间优势关系不以入侵生境的时间先后所决定，在有些地区或寄主上有 B 型烟粉虱逐步取代温室粉虱的趋势(Liu et al., 1994; 张芝利, 2000)；(2) 两种粉虱在各地危害程度上差异较大，并具有一定的规律性。温室粉虱虽然在全国 22 个省均有分布，但长期以来主要是北方的一种重要害虫；而 B 型烟粉虱在我国从南到北均是大发生，并且危害逐年加重，其自然种群有进一步扩散的趋势(张芝利, 2000)；(3) 在两种粉虱混合发生的地区，B 型烟粉虱和温室粉虱在季节发生规律上存在差异。温室粉虱在春秋两季即气候趋凉时种群数量较大，主要在温室和大棚危害；而在夏季高温季节，则以 B 型烟粉虱为主，温室粉虱较少发生，秋季气温降低后，B 型烟粉虱种群数量下降，温室粉虱上升为优势害虫(Ramos et al., 2002; 罗晨等, 2004)。

1.3 昆虫热胁迫适应性研究进展

昆虫是变温动物，对高温伤害非常敏感。昆虫耐热性的高低对其种群存在和发展有重要影响。因此，昆虫对高温的适应性及其机理一直是昆虫学领域研究中的深受重视的问题。

1.3.1 昆虫耐热性的研究方法

目前有多种研究昆虫耐热性的方法，包括统计高温处理后的存活率、高温暴露后生殖力恢复的时间以及高温暴露击倒时间(Knockdown time)等。耐热性实验通常在水浴锅或保温箱中进行。实验对象在非致死高温下暴露的时间可以是几分钟、几小时或是几周，甚至可以是整个世代(Hoffmann et al., 2003)。

昆虫经过高温暴露后统计存活率是评价其耐热性的常用方法。对于尚未发育到成虫的虫态，通常是将能够发育到下一虫态或是成虫的记为存活(Morrison and Milkman, 1978; Loeschcke et al., 1994; Feder et al., 1997; Krebs and Loeschcke, 1999)；对于成虫，通常是通过观察高温暴露后成虫对刺激是否有反应或是否能行走来判断其存活情况。放在管中的昆虫在特定温度下经过一定时间的处理后会攀附不住管壁掉下来，通过比较昆虫在高温下被击倒需要的时间或温度也可以评定其耐热性(Huey et al., 1992; Berrigan and Hoffmann, 1998)。这种方法与高温胁迫后分析存活率相比对个体的伤害比较小，这些个体还可以用于后继的杂交实验(McColl et al., 1996; Gilchrist and

Huey, 1999)。高温对昆虫的生殖影响比较大,有可能导致成虫暂时不育或生殖力的彻底丧失,因此,高温胁迫后实验对象生殖力恢复所需要的时间也是评价其耐热性高低的一个重要方法(Hoffmann et al., 1997; Kæsgaard et al., 2000; Patton and Krebs, 2001)。

1.3.2 昆虫对高温的反应

昆虫对高温的适应范围可以划分为致死高温区和亚致死高温区。在致死高温区(通常为45-60℃),昆虫暴露比较短的时间就会死亡,其存活曲线没有缓慢变化的过程,存活率从一开始就是迅速降低,这说明极端高温对昆虫的致死作用非常迅速。而在相对比较温和的亚致死高温区(通常为40-45℃),昆虫存活曲线有一部分变化比较缓慢,然后才迅速下降。因此,昆虫的死亡要取决于暴露温度的强度和处理的时间。

高温除了能够引起昆虫死亡之外,还能在昆虫后来的发育阶段引起发育异常和缺陷。昆虫对这种非致死性的高温伤害虽然不会马上就表现出非常明显的反应,但同样是致命的。例如,将 *Sarcophaga crassipalpi* 的蛹和即将发生蜕裂的成虫暴露在 50℃下 2 小时,会导致迅速死亡(Denlinger et al., 1991);在 45℃下暴露 2 小时, *S. crassipalpis* 能够存活羽化,但是羽化的成虫会由于无法出蛹壳而死亡(Yocum et al., 1994);在 45℃下暴露 80 分钟,大多数的 *S. crassipalpis* 能够扩张其额胞,打开其蛹壳,但是由于这些 *S. crassipalpi* 额胞的肌肉收缩十分无力,仍旧无法从蛹壳中出来;在 45℃下热激 60 分钟, *S. crassipalpi* 羽化十分顺利,成虫也存活的很好,可以正常交配,但是雄虫无法给雌虫授精,无法产生后代;在 45℃下暴露 30 分钟,成虫具有繁殖能力,但是其羽化的时间延迟了 1 天,成虫由黄昏羽化延迟到第 2 天中午才羽化(Denlinger and Yocum, 1998)。根据报道,33℃的高温虽然对棉铃虫的生存影响较小,但其产卵力和交配力都显著下降,并且产出的卵为无效卵(郭慧芳等, 2000)。进一步的研究表明,棉铃虫雄虫 6 龄幼虫至 3 日龄蛹以及成虫对高温敏感,高温会影响真核和无核精子的形成过程,导致蛹后期精巢中出现大量畸形精细胞囊(郭慧芳等, 2002)。昆虫精子的发生和形成是雄性生殖的核心。高温对昆虫精子发生和形成的影响还在家蚕、果蝇、小地老虎和粘虫中等有过报道(陈革等, 1986; 王荫长等, 1996; 郭慧芳等, 2002)。

高温还能诱导昆虫产生拟表型以及类似的生物突变。例如,在高温下饲养伊蚊会出现雌性化现象(Anderson and Horsfall, 1963; Horsfall et al., 1964)。当雄蚊的幼虫在 30℃下饲养时,产生正常的成虫;但是如果把饲养的温度上升到 31℃,那么至少有一半的四龄幼虫变成成虫后会产生雌性成虫所有的触角。这种雄虫不交配或者不能产生精液。引起伊蚊雌性化的温度变化非常突然,在 30℃ 的条件下,雄虫须状的触角只是稍微的变短,当饲养温度提高到 31℃时,雄虫的触角和身体的其他结构都发生了显著的雌性化现象。

1.3.3 高温对昆虫造成伤害原因

节肢动物在其正常的温度范围内PH值保持稳定,在高温情况下,PH值通常会下降。例如,在10℃到17℃, *Stoliczia abbott* 血淋巴的PH值保持不变,但超过17℃,PH值下降(Reiber and Bichard, 1993)。拟步甲 *Centrioptera muricata* 的血淋巴PH值在致死高温下(超过47℃)也观察到相似的情况(Ahearn, 1970)。PH值保持稳定对于维持细胞的微环境起着十分重要的作用。PH值的改变

可以影响细胞大分子组成成份（蛋白、核酸）的电荷状态，从而改变大分子物质的功能及结构（Hochachka and Somero, 1984）。

细胞、线粒体、微粒体和细胞核的膜都是由脂类物质构成。高温可以作用于磷脂双分子层和其它脂类成分。膜结构的改变可以改变细胞离子平衡以及膜结合蛋白的能力（Neven, 2000）。昆虫表皮对温度变化非常敏感。组成表皮的蜡质有利于昆虫保持水分平衡和减少外界环境刺激。高温能够改变蜡质复合物形态加剧干燥作用，使高温对昆虫的致死作用更为明显（Beament, 1959; Hepburn, 1985）。但是在湿度过饱和的环境中高温会导致溺死，这主要是由于昆虫的气门缺少了昆虫表皮的保护作用大量水份进入了昆虫微气管（Neven, 2000）。

高温可以改变细胞中大分子物质的数量和类型，特别是会影响蛋白质的合成。在高温胁迫下，细胞内正常的蛋白合成受到抑制，一组特殊的蛋白—热激蛋白（又称为热休克蛋白，heat shock proteins, HSPs）开始合成。在热胁迫开始发生时，机体内的蛋白质很可能受到损害，其中的一些损害可能是不可修复的（Lepock et al., 1987）。温度升高会增加生物大分子的动能，因此会降低离子、氢和范德华力与生物大分子的相互作用，从而降低生物大分子保持其结构的能力，影响其功能（Alexandrov, 1977）。例如，转运核糖体RNA复杂的二级和三级结构对于其执行功能具有重要的作用。其复杂性使得它们对高温非常的敏感，高温能够破坏其构象，影响tRNAs与特定氨基酸结合（Malcolm, 1969）。

高温导致昆虫体内发生突变，有大量关于果蝇发生热敏感条件突变的报道证明非常小的改变对昆虫的耐热性会产生重要的影响。例如，将果蝇 *D. melanogaster* AceIJ40饲养在29℃以上的高温会导致果蝇体内一种乙酰胆碱酯酶发生致命性突变（Greenspan et al., 1980）。这种对热敏感的显性突变主要是在高温条件下，一种酶发生了错误折叠，导致在某个特殊的位点发生了亮氨酸替代了脯氨酸（Mutero et al., 1994）。

1.3.4 影响昆虫耐热性的因素和一般规律

1.3.4.1 昆虫耐热性的遗传基础

有许多关于昆虫耐受极端高温的事例。例如，在热带沙漠地区，蚂蚁在沙漠表面温度达到60℃的正午出来搜寻食物(Heinrich, 1993)；家衣鱼在酷热的房子中种群旺盛。大量的实验表明，昆虫对高温的耐受性具有遗传基础，通过选择性实验可以提高物种的耐热性。例如，果蝇*D. melanogaster*通过实验室选择试验，对高温的耐受性会提高（Huey et al., 1991; Huey and Kingsolver, 1993; Cavicchi et al., 1995; Hoffmann et al., 1997; Sørensen et al., 1999）。果蝇通过热选择实验，大多数的选择反应都发生在第2条染色体上，这条染色体上有候选基因包括热激转录因子（Morrison and Milkman, 1978）。Stephanou and Alahiotis (1983)通过大规模的杂交实验选择，果蝇的耐热性提高或降低，通过杂交获得的遗传变异要比单系果蝇的遗传变异大。这些品系抗性的遗传基础大部分是细胞质因素。

1.3.4.2 地理环境对昆虫耐热性的影响

一般情况下，昆虫的耐寒性与所处的地理环境有较大的关系。处在高纬度及高海拔地区的昆虫比低纬度及低海拔地区的昆虫有更强的耐寒能力。即使对同一种昆虫，一般来说，其耐寒性也随着纬度的升高而升高。对于昆虫不同地理种群对高温的耐受能力变化研究报道不多。Hoffmann

等(2003)对果蝇 *D. melanogaster* 的 24 个不同地理种群研究表明, 其耐热性随着纬度的升高而降低。但是不同昆虫间的耐热性与他们所处的地理纬度没多大关系, 例如, 对澳大利亚温带(38°S)和热带(17°S) *D. melanogaster* 和 *D. simulans* 的野外种群进行研究发现, 它们在对高温的耐受性上表现很少的地理差异 (Hoffmann and Watson 1993)。甚至在巴拿马热带低海拔地区采集的果蝇的耐热性比在北美温带采集的近缘种的耐热性还要低一些(Chen et al., 1990)。这可能是因为在这些研究中的温带地区夏季的最高温度与热带地区的最高温度没有多大的差别。

1.3.4.3 不同发育阶段和滞育对昆虫耐热性的影响

同一物种不同发育阶段对温度的耐受能力也存在相当大的差异。例如, *S. crassipalpis* 在 45°C 热激条件下, 发生蜕裂的成虫的耐热性最高, 其次是蛹, 再次为三龄幼虫 (Chen et al., 1991)。昆虫的滞育对环境胁迫耐受性的影响也十分重要: 这是由于处于滞育期间的昆虫代谢活动和细胞循环的特性使得昆虫对于高温以及其他环境胁迫因素具有很强的耐受性。例如, 将 *Ephestia elutella* 没有滞育的幼虫暴露在高温下一定的时间, 虽然这些幼虫可以正常羽化为成虫, 但是幼虫期的高温暴露会导致成虫不育; 但是将滞育的幼虫放在相同的温度条件下进行高温处理, 成虫的生殖能力没有受到影响 (Bell, 1983)。

1.3.4.4 驯化和短时锻炼对昆虫耐热性的影响

驯化是在生物非致死低温或高温范围内长时期(数天或数星期)暴露, 并获得增强的耐寒性或耐热性。它会同时导致生物体发生可逆和不可逆的生理变化。短时锻炼 (Hardening) 是相对于驯化 (Acclimation) 而言的一种非致死高温或低温驯化, Lee 等 (1987) 发现短时间(数小时甚至数分钟)低温暴露也可明显增强耐受极低温度的能力, 使它们免于遭受过冷却点以上的低温的伤害。这个过程称为短时锻炼 (Rapid cold hardening)。在高温下也有锻炼现象。它导致的体内生理变化尽管有些会在昆虫的整个生命历期有影响, 但几乎都是可逆的 (Khazaeli et al., 1997)。在进化生物学文献中, 锻炼和驯化经常交换使用, 来说明生物对温度的可塑性反应。但也有生理学家认为两者代表不同的过程, 反映的是不同的机理 (Cossins and Bowler, 1987)。研究证明, 驯化和锻炼都能够提高昆虫的耐热性。例如, 将 *D. melanogaster* 幼虫分别在 28°C 和 25°C 进行饲养, 则前者的成虫要比后者的耐热性高。Krebs and Loeschcke (1995) 发现将 *D. buzzatii* 的蛹在 38°C 热激 1 小时, 其成虫的耐热性也会显著提高。

1.3.4.5 其它因素对昆虫耐热性的影响

昆虫个体大小对温度胁迫的耐受能力也有影响。*D. willistoni* 和 *D. melanogaster* 小的个体与较大的个体相比, 在高温下小个体会很快的死亡 (Levins, 1969), 这很可能是由于小个体对干燥更为敏感, 干燥和高温的相互作用会加剧其死亡的缘故。耐热性的提高有时候需要通过选择, 但并不是一定与温度直接相关。其他方面的抗性选择有可能会影响到耐热性的变化。例如通过 malathion (一种杀虫剂) 的抗性筛选, *Tribolium castaneum* 表现出耐热性增强, 但是对寒冷、干燥或是饥饿的耐受性并没有提高 (Shukla et al. 1989)。

1.3.5 昆虫耐热性机制

生物体在一定时间(几小时、几分钟、甚至几秒钟)内遭受高于其正常生长温度 5-10°C (一般称为亚致死温度 sub-lethal temperature) 以上的温度时, 体内一般会新合成一类蛋白质—热激蛋白 (又

称为热休克蛋白, heat shock proteins, HSPs), 这是目前最为人们广泛所知的与耐热性相关的物质(Lindquist, 1986)。热激蛋白可作为分子伴侣, 参与细胞内新生肽链的转移, 以及识别变性蛋白质, 在昆虫对抗不良环境过程中有着重要作用 (Lindquist, 1986; Feder and Hoffmann, 1999) (详见第一章绪论1.4节)。

生物体内多羟基化合物的积累对其抵抗极端温度的胁迫也十分重要。例如, 二糖和海藻糖的积累有助于真菌、细菌抵抗极端高温和低温。近年来也发现甘露醇、山梨醇在蚜虫和粉虱耐高温方面起了非常重要的作用(Wolfe et al., 1998; Salvucci et al., 1999, 2000; Salvucci 2000)。温度能够刺激蚜虫和粉虱体内甘露醇、山梨醇的积累, 蚜虫和粉虱将从食物中获得果糖作为底物, 在 NADPH 酮糖还原酶的作用下将果糖转变成甘露醇或山梨醇(Salvucci and Wolfe, 1998)。蚜虫和粉虱体内积累甘露醇或山梨醇的量随着一天气温的变化而变化, 中午两者体内积累的甘露醇或山梨醇要比清晨低得多。分析两者的蜜露成分发现, 蜜露中所含糖分与二者体内的糖存在很大的差别, 蜜露中只含有非常少的甘露醇或山梨醇 (Hendrix and Salvucci, 1998)。甘露醇、山梨醇是蚜虫和粉虱耐热的一个重要机制。

1.4 热激蛋白研究进展

热激蛋白最先是在果蝇体内发现。1962年遗传学家Ritossa等研究发现, 将果蝇的培养温度从 25℃ 提高到 30℃, 30 分钟后就可在幼虫唾液腺多丝染色体上看到蓬松现象 (或称膨突 puff)。进一步观察认为, 热激诱导的果蝇染色体膨突现象不存在组织和发育期的差异, 其膨突的生成与该区带的基因转录加强有关, 某些蛋白质的合成也可能增加。1974年, 后人从热休克果蝇幼虫的唾液腺等部位分离到了 6 种新的蛋白质, 即热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) (Tissieres and Mitchell, 1974)。1982年Adams等证实, 一切生物细胞 (包括原核细胞和真核细胞) 在遭受高温诱导后体内均可合成热激蛋白, 而生物体或细胞受到高温刺激表达热激蛋白的过程被称为热激反应 (heat shock response)。

1.4.1 热激蛋白的分类与特性

目前依据热激蛋白分子量大小和同源性进行分类, 一般可以分为 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 和小分子质量 HSP 家族 (small HSP, sHSP, 分子量低于 30kDa 的热激蛋白), 每个家族包括 1 至数个相关基因 (Sørensen et al., 2003)。根据功能进行分类, 热激蛋白可以分为组成型热激蛋白 (heat cognate protein, HSC) 和诱导型热激蛋白 (heat inducible protein, HSP)。组成型热激蛋白又被称为热休克相关蛋白, 在正常生理条件下的细胞中就大量存在, 应激后的表达量进一步提高, 大多与维持细胞基本生理功能和形态建成密切相关; 而诱导型热激蛋白 HSPs 在正常生理条件下不存在或表达量低, 但在热刺激下能被强烈诱导, 具有保护细胞的功能 (Parsell and Lindquist, 1993, 1994)。组成型热激蛋白和诱导型热激蛋白在核苷酸序列上高度同源, 蛋白结构和功能很相近, 统称为 HSPs。

热激蛋白在生物界中的一个重要特点是它们在进化过程中的高度保守性, 热激基因家族是迄今为止被发现的最为保守的遗传系统。例如, 细菌和果蝇编码 HSP70 的基因 50% 以上同源; 对大肠杆菌、酵母、果蝇和人体 HSP70 的氨基酸序列进行分析, 可发现它们具有 80% 以上的相似

性(Craig, 1985)。热激蛋白在生物界广泛存在, 在结构上比较保守, 说明热激蛋白对于生物的生命活动有比较重要的意义。

1.4.2 热激蛋白的诱导因子

尽管最先发现的是热刺激是能够诱导产生热激蛋白, 但现在大量研究发现重金属、缺氧、寒冷、感染、饥饿、创伤、其他一些代谢物质以及异常蛋白的累积等因素都能诱导产生热激蛋白(表1-1)。因此, 热激蛋白又称应激蛋白(stress protein, SP), 但习惯上仍称之为热激蛋白。

1.4.3 热激蛋白的主要功能

1.4.3.1 充当分子伴侣

细胞内的蛋白质为了完成其生物学功能, 其肽链需经正确的折叠、加工、定位于细胞内的合适位置, 有时还需要与其它多肽链形成复合体。细胞浆内蛋白质浓度很高, 从核糖体上新合成的多肽链在其成熟过程中会与其它蛋白质的结构域发生结合, 为了防止蛋白质的错误折叠, 应当避免成熟前蛋白质结构域之间的接触。而蛋白质穿过生物膜的过程中需要伸展结构, 此时就需要热激蛋白发挥充当“分子伴侣”(molecular chaperone)的作用来维持蛋白质的伸展状态并阻止其错误结合(Laskey et al., 1978)。根据研究, 热激蛋白作为“分子伴侣”主要功能有在细胞内多肽折叠、组装和解组装时作为辅助蛋白, 识别和稳定部分已折叠的中间体, 指导蛋白质的初始折叠, 对已解除折叠的进行再折叠; 协助细胞器成分的胞内定位, 恢复、水解或解聚变性多肽的无序聚集体; 调节ATP的功能系统等(Wang et al., 2004)。不同的热激蛋白家族所担负的主要功能又有所差异(Parsell and Lindquist, 1993)。

1.4.3.2 使生物体获得耐热性

耐热性的获得是指细胞或生物体在经过亚致死高温的处理后, 往往能够耐受更高温度的胁迫(Moseley, 1997)。大量研究证明, 这种耐热性的获得与生物体或细胞内HSPs的累积有密切关系(Parsell and Lindquist, 1994; Sørensen et al., 1999, 2001)。高温处理果蝇成虫, 检查不同时段后HSP70的水平, 发现果蝇耐热性与HSP70的表达正相关(Dahlgaard et al., 1998)。在培养的果蝇*D. melanogaster*细胞中导入hsp70基因, 其耐热性的获得要比没有导入hsp70基因的细胞要快, 当在果蝇细胞中导入抑制热激蛋白表达的基因时, 其耐热性的获得要比没有导入hsp70基因的细胞要慢(Solomon et al., 1991)。HSPs的导入可以使原本对高温敏感的果蝇初生精子细胞具备耐热性。*S. crassipalpis*在不能合成热激蛋白的胚胎时期, 对高温非常的敏感(Dura, 1981)。不同生物体在热刺激下产生的HSPs有所不同。例如果蝇和酿酒酵母在同样的热刺激条件下, 酿酒酵母中表达HSP100, 而果蝇表达HSP70(Velazquez et al., 1983)。许多研究表明HSPs的表达不仅和耐热性有关, 而且不同种类的HSPs的热稳定作用还可以互相替代(Jinn et al., 1989; Jinn et al., 1993)。例如, 从大豆富含HSPs的组分中除去15-18 kD的HSPs, 热稳定性丧失, 加入纯化的28 kD的I类sHSPs复合体, 这种保护作用又恢复(Jinn et al., 1993; Jinn et al., 1995)。此外, 其它胁迫因素诱导产生的HSPs也有提高耐热力的作用。例如, 将拟麻蝇非滞育蛹在-10℃中处理2h, 大量合成小分子HSP23, 蛹的耐寒与耐热能力明显提高。随着蛹进入滞育期, 合成HSP23的mRNA表达增加, 滞育蛹对环境温度变化表现出很大的耐受性(王荫长, 2001)。

表 1-1 诱导热激蛋白表达的生态相关因子

Table 1-1 Ecological relevant inducers of HSPs

胁迫因素 Stress factors	参考文献
环境因素 Environmental factors	
高温 High temperature	Tissières et al., 1974; Jenkins et al., 1997; Otsuka et al., 1997; Li et al., 1999; Sonna et al., 2002
低温 Low temperature	Jenkins et al., 1997; Goto et al., 1998; Li et al., 1999; Martinez et al., 2001; Sonna et al., 2002; Sejerkilde et al., 2003
辐射 Radiation (UV)	Trautinger et al., 1996; Jenkins et al., 1997; Kiriya et al., 2001
重金属 Heavy metals	Steinert and Pickwell, 1993; Köhler and Eckwert, 1997; Werner and Nagel, 1997; Tedengren et al., 1999
杀虫剂 Pesticides	Werner and Nagel, 1997; Ait-Aissa et al., 2000; Yang et al., 2002; Nazir et al., 2003
缺氧 Hypoxia	Ma and Haddad 1997
盐度 Salinity	Diamant et al., 2001; Drew et al., 2001; Hamilton et al., 2001; Spees et al., 2002
高密度 High density	Sørensen and Loeschcke, 2001
细菌和病毒感染 Bacterial and viral infection	Collins and Hightower, 1982; Polla, 1988; Kaufmann and Schoel, 1994; Deitch et al., 1995
寄生 Parasitism	Merino et al., 1998; Rinehart et al., 2002
物理行为 Physical activity	Skidmore et al., 1995; Fehrenbach and Niess, 1999
干燥 Desiccation	Alamillo et al., 1995; Tammariello et al., 1999
氧化胁迫 Oxidative stress	Ropp et al., 1983; Gophna and Ron, 2003
遗传因素 Genetic factors	
衰老 Senescence	Wheeler et al., 1999
杂交 Inbreeding	Kristensen et al. 2002
有害突变 Deleterious mutations	Sherman and Goldberg, 2001; Trotter et al., 2002; Zhao et al., 2002

此表引自Sørensen et al., 2003. The table cited from Sørensen et al., 2003.

但是HSP70对细胞的保护作用并不是无限的，它只能在一定范围内起作用。如果应激超过一定的强度，或持续时间过长，HSPs的保护作用也是无能为力的。如王枫等(2000)发现当细胞在45℃热暴露达到6 h以上时，不管是HSP70表达高的细胞还是HSP70表达低的细胞，其细胞活力均降低。这主要是因为应激时间过长，使维持细胞正常生长的蛋白质合成受阻，威胁细胞的生存；同时变性蛋白过多的产生超过了HSP70的保护能力，所以影响了细胞的功能，引起细胞死亡（李俊杰等，2004）。

1.4.5 热激蛋白基因及其表达调控

果蝇的hsp70基因家族有两个诱导型成员，分别是hsp68和hsp70 (Velazquez et al.,1983)，hsp68在95D有一个拷贝，编码70kDa诱导型HSPs的基因分成两簇，hsp70A和hsp70B，分别位于87A和87C位点，87A位点有2拷贝的编码基因，87C位点有3拷贝的编码基因，几种基因编码同一种多肽说明了这种基因产物的重要性。87A和87C位点形成的mRNA序列之间有15%的差异。同一位点的不同基因间限制酶图谱略有不同。缺失hsp70A和hsp70B中的任何一个都不能消除产生HSP70的热激反应，但同时缺失就不会产生该反应。大多数的诱导型hsp70基因都没有内含子，这与受热激时需要快速诱导hsp70而避开mRNA加工这一易出错的步骤有关。

热激基因表达调控包括选择性转录和选择性翻译两个方面，以前者为主。生物体内有一种转录调节因子在热激条件下可激活热激基因的表达，被称为热激转录因子(heat shock factor, HSF)。目前在不同生物细胞中发现了多种 HSF，如人与小鼠体内存在两种 HSF (HSF1 与 HSF2)；鸡体内存在 3 种 HSF (HSF1、HSF2 与 HSF3)，但是仅 HSF1 介导热应激基因的转录，其它形式的 HSF 可能与细胞的发育和分化有关；酵母和果蝇体内仅有 1 种 HSF，是主要的胁迫诱导因子(Nakai and Morimoto, 1993)。热激基因 5' 端上游的一小段特异的 DNA 序列，是 HSF 的结合位点，被称为热激元件(heat shock element, HSE)。HSF 和 HSE 的结合就会激活热激基因的表达。1993 年，Morimoto 提出了热激基因表达的调节模式，即在正常条件下，热激转录因子与热激蛋白相互作用来保持不与 DNA 结合的非活性状态，在热激或其它胁迫时，错误折叠和凝聚的蛋白的增加就产生了一大群可以与热激转录因子竞争结合 HSP 的底物，这样热激和其它刺激因子就除去了抑制热激转录因子的 DNA 结合活性的因素，释放出的热激转录因子组装成三聚体并结合到热激转录元件上，开启热激基因，进行热激蛋白的表达，表达出的热激蛋白中当然也包括大量的 HSP70，当 HSP70 累积到一定程度时又与 HSF 结合，HSF 和 HSE 分离，转录停止，从而实现反馈抑制热激反应。例如，将变性蛋白微注射入爪蟾卵母细胞后，即可诱导细胞的 HSP70 的表达。当合成的 HSP70 达到一定浓度时（此时机体的热应激被缓解甚至消失），HSP70 又重新与 HSF1 结合，使 HSF1 脱离 DNA 序列，造成激活的 HSPs 基因关闭(Stone and Craig, 1990)。

HSPs 的表达调控除了在转录水平上进行外，还包括选择性翻译(Morimoto, 1998)。非洲爪蟾卵母细胞中存在着大量的 hsp70 mRNA，但只有在热激时才合成 HSP70，这种热激诱导的翻译过程可能是由于核糖体内某些蛋白在高温时的脱磷酸化作用(Browder et al., 1987; Horrell et al., 1987)。热激蛋白 mRNA 的选择性翻译与其 5' 端不翻译的先导序列有关，果蝇 hsp70 mRNA 一旦缺失其先导序列，即使高温时也不能翻译成热激蛋白(孙旭彤等, 2002)。用融合基因实验证明，当 hsp70 启动子先导序列融合到非热激诱导的乙醇脱氢胺基因上时，该基因在高温能被有效地翻译。对胡萝卜细胞和胚胎的实验结果表明，愈伤组织细胞中虽然积累了大量的热激蛋白 mRNA，但仍能被优先翻译，因此胡萝卜热激蛋白基因的表达调节主要是在翻译水平上。这种调节发生可能是某种变化使得球状胚热激蛋白 mRNA 能更好地与核糖体结合，使其有更高的表达效率。

1.4.6 热激蛋白与生物环境适应及进化的关系

热激蛋白作为一类对体内外环境变化极为敏感的有机分子广泛参与各种生理代谢途径，一直都是生物学研究领域中的一个热点。在过去的40年中，人们对热激蛋白的种类、分布、功能和基

因表达调控等方面进行了深入的研究,并取得了不错的进展。在研究过程中人们发现部分诱导型热激蛋白的表达能够对生物体的发育、耐受性、生殖、寿命等产生影响;而生物体在自然界中处在不断变化的环境中,难免会遭受外界多种因素的胁迫,因此猜测热激蛋白在生物环境适应和进化方面很可能有着重要作用。由此也吸引了越来越多的研究者开展相关研究,研究范围也从实验室研究扩大到自然种群(Feder and Hofmann, 1999; Sørensen et al., 2003)。

1.4.6.1 热激蛋白对环境适应的影响

热激蛋白在生物对环境适应中最引人注意的作用就是生物体在受到胁迫刺激后,对胁迫抗性的提高与热激蛋白表达上升普遍成正相关(Lindquist, 1986; Feder and Hofmann, 1999)。目前在昆虫(Gehring and Wehner, 1995; Dahlgaard et al., 1997)、鱼类(Basu et al., 2002)、植物(Sun et al., 2002)和哺乳动物(Ulmasov et al., 1993)的研究中都观察到热激蛋白的表达(降解)与热适应性的出现(消失)有密切的时空关系。

温度是决定许多物种生态位宽度的重要因子(Bale, 2002),特别是对极端温度的抵抗力与物种的生态分布有密切联系。而诱导 HSPs 产生的温度阈值可以从一定程度上反映物种的热胁迫适应能力。通常耐热性高的物种的诱导阈值比耐热性低的物种要高。例如,沙漠蚁(*Cataglyphis*)和温带种红木蚁(*Formica polystena*)虽然有类似的 HSP70 表达模式,但前者在 45℃ 仍能继续合成 HSPs,而后者在 39℃ 时 HSPs 的合成即受到抑制(Feder and Hofmann, 1999)。北极鱼的 HSPs 在 5℃ 左右被诱导,而一种耐热细菌在 100℃ 左右才会被诱导(Parsell and Lindquist, 1994)。

热激蛋白基因的特点和表达差异除了与遗传特性相关外,还与物种栖息地环境有关。例如,虾虎鱼(*Gillichthys* sp.)夏季种群脑组织中 HSP90 的含量比冬季种群高,诱导阈值也比冬季种群高 4℃(Dietz and Somero, 1992)。4 种溪流生活的鱼类(*Pimephales promelas*, *Salmo trutta*, *Ictalurus natalis*, *Ambloplites rupestris*)肌肉组织中 HSP70 的含量与季节变化相关(Fader et al., 1994)。由于缺乏潮汐带来的温度波动刺激,在实验室培育的杜父鱼在经受自然潮汐变化时的存活率远远低于自然种群(Nakano and Iwama, 2002)。在种群水平上,热激蛋白基因的特点和表达差异与昆虫所适应的温度、气候和纬度变化呈现一定的相关性(Gehring and Wehner, 1995; Sørensen and Loeschke, 2002; Frydenberg et al., 2003)。

1.4.6.2 热激蛋白氨基酸序列和基因结构变异与环境适应

尽管热激蛋白氨基酸序列保守,编码序列变异比较低,但是近期已经有证据表明热激蛋白基因存在着变异,并且这类变化与生境差异之间存在着一定的相关性。Evgen'ev 等(2004)发现 hsp70 基因的拷贝数与不同纬度果蝇种群的行为有潜在的联系。在 hsp70 基因内部, Bettencour 等(2002)检测到适应不同温度的果蝇种群间存在两个显著差异,一个大的插入/缺失多肽位点(56H8/122)和一个单核苷酸多肽位点差异,对于来自澳大利亚东部不同纬度的 11 个地理种群,插入/缺失位点的频率与纬度呈正相关,由于纬度与温度最大(小)值和平均值成负相关,提示温度和热值变化可能对 hsp70 基因的这一变异频率产生了影响。Anderson 等(2003)也发现 *D.melanogaster* 3 号染色体右臂上的 hsr-omega 基因的 8bp 缺失作为一个遗传标记与纬度呈正相关,另一个 3 段重复的标记则多出现在温带群体中,与冷适应性相关。适应于较低纬度的 *D.virilis* 有 7 个 hsp70 基因拷贝,其热胁迫抗性要高于具有 5 个拷贝的 *D.lummei*,后者在分布上处于较高的纬度,提示 hsp70 基因结构与果蝇的适应纬度有关。其他的相关结果也说明保守的热激蛋白基因的结构似乎保留着对环境长期适应的线索,能部分反映自然选择的结果。

1.4.6.3 热激蛋白表达获得适应优势和付出代价之间的均衡

生物体通过提高 HSPs 表达量获得耐胁迫能力的同时,往往需要付出一定的代价,如生殖力降低、生长缓慢、能量消耗增加、寿命缩短等(Tatar, 1999; Krebs and Feder, 1998; Vollmer, 2004)。研究表明,热激蛋白持续高水平表达或是在无刺激的情况下表达对生物体是有害的。例如,果蝇 *D. melanogaster* 在缺乏压力刺激的情况下,如果提高 Hsp70 的水平,那么在正常的饲养温度下的存活率将会降低(Feder et al., 1992; Krebs and Feder, 1997)。这也可以解释为何细胞会在受激结束后迅速关闭诱导型热激蛋白表达途径;在早期发育和细胞分化活跃时期,组成型热激蛋白的含量为何会很低。因此对于频繁遭受胁迫的群体来说,仅通过表达热激蛋白获得抗性的代价太高,往往需要通过多种途径获得胁迫适应性(Krebs and Bettencourt, 1999)。在对果蝇的研究中发现,在频繁持续遭受胁迫的果蝇体内 HSP70 表达水平很低(Bettencourt et al., 1999; Sørensen et al., 1999);在对果蝇的自然种群(Sørensen et al., 2001)以及接触重金属的土壤无脊椎动物(Köhler et al., 2000)的研究中也发现了相同的情况,即与环境胁迫抗性有关的 HSPs 的适应作用,似乎是只出现在发生相对很少、无法预料的极端胁迫的阶段,而不是发生在随时都会出现的环境波动中。由此也说明热激蛋白的表达需要维持一个精细的平衡:一方面是获得耐胁迫能力,一方面是削弱发育、生殖和代谢等功能,生物体在这两者的均衡间适应和进化。

1.5 本文的总体研究思路、主要内容

很多因素,包括生物因素和非生物因素会影响到昆虫的生存和建立种群,例如:生活史和寄主植物的协调,致死温度和热需求等(Danks 1996; Bird and Hodkinson, 1999; Hodkinson, 1999; Bale et al., 2002)。但对于粉虱这类多食性昆虫,寄主选择谱很宽,没有滞育,其分布范围更多地取决于它们的生理适应和需求,很大程度上与寄主获得程度(availability)和生活史(life history)对策无关(Hodkinson et al., 1999)。而温度对许多物种的生态位宽度具有决定作用,特别是极端温度对昆虫的繁殖和生存等具有关键的限制作用。在长期的适应进化过程中,物种对极端温度的适应性会影响到极端温度的长期选择使其群体获得对环境胁迫的抵抗力,并得以保持和遗传,最终使该昆虫在物种竞争和适应过程中得以生存和繁衍(Bale et al., 2002; Hoffman et al., 2003)。

B 型烟粉虱和温室粉虱是先后入侵我国的外来害虫,在生境适应过程中种群优势关系具有地域性和季节性差异。我们推测这种时空差异很可能与它们对温度,特别是极端温度的适应性差异有关。为此,我们提出假说:在 B 型烟粉虱和温室粉虱种群扩散的过程中,两者为适应环境胁迫特别是热胁迫(thermal stress)的选择而发展了不同方向的耐胁迫能力(stress tolerance),这种适应性分化是导致两种粉虱目前在我国发生存在时空差异的主要原因。为了证明以上假说,我们从生物学和分子生物学两个方面对两种粉虱热胁迫适应性进行了研究,以期从宏观到微观的角度揭示这种生态学现象的本质。本文主要研究 B 型烟粉虱和温室粉虱的高温适应性及其差异,具体研究内容包括:

1. B 型烟粉虱和温室粉虱种群发生存在时空差异是我们需要阐明的核心生态学现象。本文的实质是揭示高温对两种粉虱种群发生的影响,因此两种粉虱对高温胁迫的适应性差异是本文研究的重点。

2. 高温能导致生殖适应性降低(如产卵量下降,后代生存能力降低等),这会直接影响到种

群后代的生存规模和质量,并进一步表现在种群的相对优势上。因此,高温对两种粉虱的生殖适应性的影响差异可能是导致两种粉虱种群发生动态存在差异的直接原因。为此,我们将研究热胁迫对两种粉虱生殖适应性影响,期望从比较生物学的角度阐明这一生态学现象。

3. 生物对热胁迫最基本的反应是热激蛋白的表达。许多研究表明热激蛋白的表达对耐热性有明显的调节作用。因此,我们克隆了 B 型烟粉虱和温室粉虱 *hsp70* 基因 cDNA 片段,为研究两种粉虱热胁迫适应性的分子机制研究打下了基础。

4. 利用荧光定量 PCR 的方法,构建 B 型烟粉虱热激蛋白 *hsp70* 基因表达检测体系,研究 *hsp70* 基因表达在 B 型烟粉虱抵抗高温胁迫中的作用,探讨 B 型烟粉虱对高温的适应性在其种群发生和扩张中的作用,为研究其它入侵物种的种群扩张机制提供借鉴。

第二章 B 型烟粉虱和温室粉虱耐热性研究

胁迫 (Stress) 是指扰乱生物系统正常功能或是降低其适应性的条件, 通常胁迫包括外在因素 (如环境因子) 和内在因素 (如有害突变、衰老、近亲繁殖等) 两个方面 (Hoffmann and Parsons, 1991; Bijlsma and Loeschke, 1997)。物种对胁迫因素的耐受或适应能力对其种群的发展有着重要作用 (Hoffmann and Parsons, 1991; Sørensen et al., 2003)。

在自然界中, 昆虫普遍要经历不同栖境和不同季节温度的变化, 包括冬季低温和夏季高温的胁迫 (Jenkins et al., 1999; Otsuka et al., 1997; Sonna et al., 2002; Sejerkilde et al., 2003)。因此, 热胁迫实际至少包括高温胁迫和低温胁迫两个方面。相应的, 昆虫为抵御热胁迫发展了耐高温能力 (耐热性, heat tolerance) 或/和耐低温能力 (耐寒性, cold tolerance)。在过去的十年里, 耐热性和耐寒性研究涉及的地理界限和物种种类更为广泛, 这些研究使人们意识到所有的物种都有一定的耐寒和耐热本领, 这种本领和其它因素一起决定了它们的分布和未来区域扩散的机会 (Bale, 2002)。

本章将研究高温对两种粉虱存活率的影响, 以揭示 B 型烟粉虱和温室粉虱对高温的耐受性以及两者之间的差异, 探讨两种粉虱耐热性对其种群分布和发生的影响。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试昆虫和寄主植物

实验中所用的B型烟粉虱和温室粉虱均采自温室中长期保持的实验种群。饲养B型烟粉虱和温室粉虱的寄主植物分别为甘蓝 (京丰1号) 和番茄 (中蔬5号)。以上寄主植物的种子均购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

实验使用的寄主植物为甘蓝 (京丰1号) 和番茄 (中蔬5号)。甘蓝和番茄经过育苗后单株种植在营养钵中 (直径为9cm), 甘蓝长至5-6片真叶, 番茄长至约20cm高时供实验使用。

2.1.2 热胁迫对两种粉虱不同虫态存活的影响

2.1.2.1 热胁迫处理方法和饲养条件

热胁迫在人工气候箱中进行 (型号: MhT-350, 日本三洋电机股份有限公司), 设置 5 个暴露温度, 分别为 37℃、39℃、41℃、43℃和 45±0.2℃。在每个温度梯度下, 分别处理 1、2、4、6h。处理结束后, 卵和伪蛹在人工气候箱 (型号: PRX-500D-30, 中国宁波海曙赛福实验仪器厂) 中进行饲养。饲养条件为: 26±0.5℃, 60-70% Rh, 光周期 14:10 h (L:D)。直至发育到下个虫态。成虫处理结束后放在 26±0.5℃下 2h 后调查存活情况。

2.1.2.2 粉虱处理和调查方法

卵: 选取长势基本一致的甘蓝, 用毛笔清理干净叶片表面。将每 4 株甘蓝为一组放入一个纱笼中 (60×50×70cm; 120meshes/cm²)。每个笼中接入 200 头以上的B型粉虱成虫, 24h后驱除成虫, 在解剖镜下统计每张叶片上的产卵量。每批 3-4 株甘蓝。然后将带有B型烟粉虱卵的甘蓝在高温下暴露一定的时间后放在人工气候箱中 (方法 2.1.2.1)。4 天以后开始调查B型烟粉虱卵孵

化的情况，为了减少操作过程中的损伤，以后每隔 2 天调查 1 次，直到连续 4 天都没有卵孵化为止。最后统计卵的孵化率。

伪蛹：采集带有 B 型烟粉虱伪蛹的叶片，保留叶片上出现红色眼点的伪蛹，清除其它虫态。统计每张叶片上的伪蛹数，一般每张叶片上的伪蛹数不少于 50 头。每批 3-4 片叶。将带有 B 型烟粉虱伪蛹的叶片放在直径为 9cm 的培养皿中，用滤纸进行保湿。将伪蛹在高温下暴露一定的时间后放在人工气候箱中（方法 2.1.2.1）。24h 以后开始调查成虫羽化的情况，以后每隔 24h 调查 1 次，直到没有成虫羽化出来。最后计算羽化率。

成虫：采集 B 型烟粉虱成虫于玻璃管中(2.4×8cm in diameter)，管口用纱布包扎以防止成虫逃逸。每管不少于 50 头成虫。每批 3-4 管，将成虫放在高温下暴露一定的时间后放在人工气候箱中（方法 2.1.2.1）。2h 后记录其存活情况，统计其存活率。

以上每个处理 3 次重复，温室粉虱实验操作方法同 B 型烟粉虱。将两种粉虱不同虫态没有经过高温暴露直接放置在 26℃ 下的处理为对照，用来校正各虫态的存活率。

2.1.3 两种粉虱不同性别成虫耐热性研究

采集新羽化的粉虱成虫于指形管，每管 1 头成虫。在解剖镜下辨别雌雄后进行分组，每组粉虱的雌雄个体均不少于 50 头。然后分别放置在温度设置为 37℃、39℃、41℃、43℃ 和 45±0.2℃ 人工气候箱中 1 h。处理结束后将粉虱放置在温度 26±0.5℃ 的人工气候箱中，2h 后记录其存活情况，统计其存活率。每个处理重复 5 次。将没有经过高温暴露直接放置在 26℃ 下的处理为对照。

2.1.4 高温驯化对两种粉虱耐热性的影响

采集粉虱成虫于玻璃管中(2.4×8cm in diameter)，管口用纱布包扎以防止成虫逃逸。将 B 型烟粉虱成虫放在 37℃ 暴露 30min 后分别在 45℃ 下暴露 1h；温室粉虱成虫放在 37℃ 暴露 30min 后分别在 43℃ 下暴露 1h。待成虫苏醒后，记录其存活情况，统计其存活率。

2.2 数据处理

在相同条件下两种粉虱存活率用 t-Test 来检验是否存在显著差异；用多因素方差分析检验温度和时间对粉虱存活率的效应。不同虫态间的耐热性差异用单因素方差分析来检验是否存在显著性差异。以上数据分析用统计软件 SPSS 进行（SPSS10.0, SPSS Inc., USA），显著性检验水平均为 $P \leq 0.05$ 。

2.3 结果与分析

2.3.1 高温胁迫对两种粉虱卵孵化的影响

随着暴露时间的延长和温度的升高，B 型烟粉虱和温室粉虱卵的孵化率均降低，并且在相同的处理条件下温室粉虱卵的孵化率要低于 B 型烟粉虱（图 2-1）。B 型烟粉虱和温室粉虱的卵在 37℃ 下暴露 1-6h 或是在 39℃ 下暴露 1h，温室粉虱卵的孵化率略低于 B 型烟粉虱，但没有达到显著差异（ $t = 0.021-6.12$, $df = 1, 18$, $P = 0.11-0.66$ ）。但在 39℃ 下暴露 2-6h 或是 39℃ 以上的高温暴露

1-6h, B 型烟粉虱卵的孵化率要显著高于温室粉虱。例如, 在 39℃ 暴露 2h, B 型烟粉虱有 86.3% 的卵可以孵化, 但温室粉虱卵的孵化率只有 68.2% ($t=5.64, df=1,18, P<0.0001$)。43℃ 和 45℃ 以上的高温, 随着暴露时间的延长, 两种粉虱卵的孵化都受到明显的抑制作用, 在相同的处理时间下, B 型烟粉虱卵的孵化率要高于温室粉虱。在 45℃ 的高温条件下, 温室粉虱的卵暴露 1h 后, 不到 50% 的卵可以孵化; 而 B 型烟粉虱的卵在 45℃ 下暴露 2h 孵化率仍超过了 50%。

高温和暴露时间对 B 型烟粉虱卵的孵化都有显著影响 (温度: $F_{(4,180)}=128.83, P<0.0001$; 时间: $F_{(3,180)}=282.76, P<0.0001$)。温度和暴露时间对 B 型烟粉虱卵的孵化存在着显著的交互效应 ($F_{(12,180)}=6.53, P<0.0001$), 且暴露时间的效应要高于温度 ($\text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.83 > \text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.74$)。高温对温室粉虱卵孵化的抑制效果显著 ($F_{(4,180)}=279.04, P<0.0001$), 暴露时间对温室粉虱存活率的影响亦显著 ($F_{(3,180)}=298.91, P<0.0001$); 其中温度的效应要高于暴露时间的效应 ($\text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.86 > \text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.83$); 温度和时间对温室粉虱的存活具有明显的交互作用 ($F_{(12,180)}=3.44, P<0.0001$)。两种粉虱的耐热性存在显著性差异 ($F_{(1,360)}=326.76, P<0.0001$)。

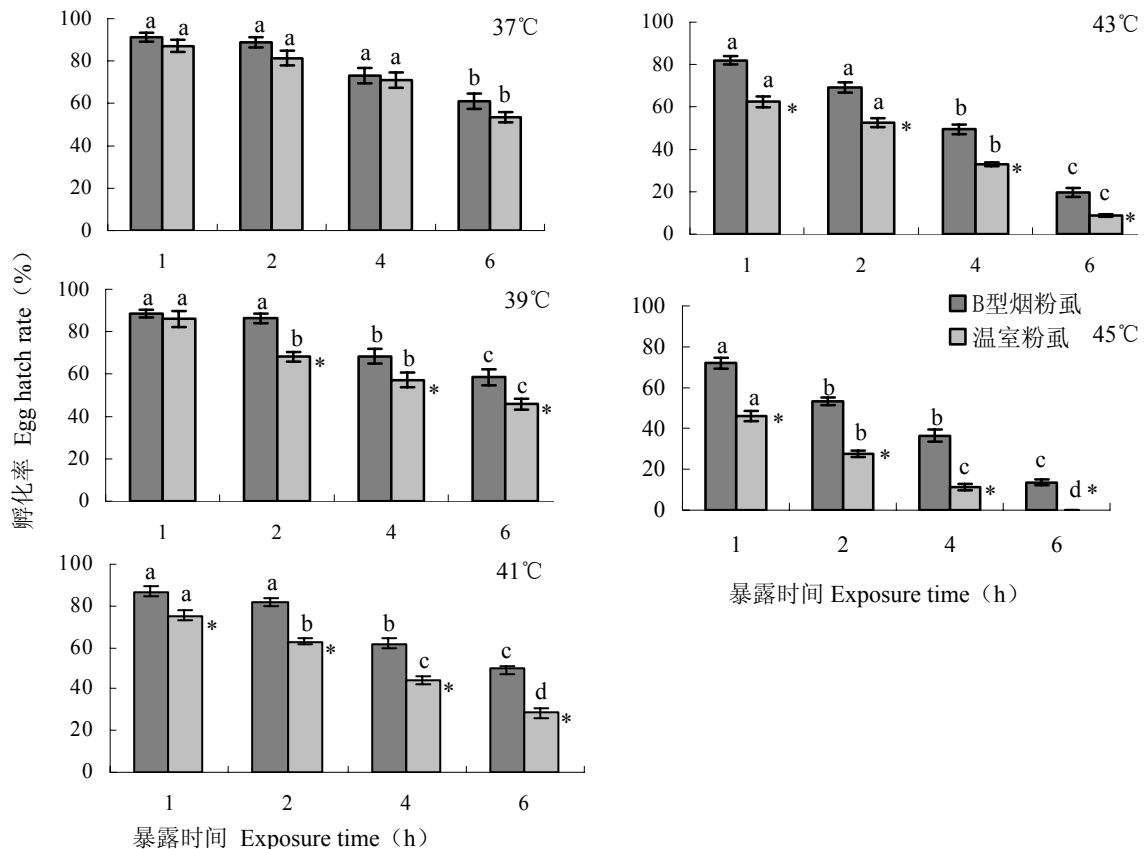


图 2-1 B 型烟粉虱和温室粉虱卵经过高温暴露后孵化率 (%)。柱上不同字母表示同种粉虱卵暴露不同时间后的存活率在 0.05 水平存在显著差异; ‘*’表示两种粉虱卵的孵化率之间存在显著差异。

Fig. 2-1 Egg survivals of *B. tabaci* B-Biotype and *T. vaporariorum* after exposure to high temperatures. Different letters above error bars indicate the egg hatch rate (%) differ significantly at $P \leq 0.05$ level for each whitefly species; the ‘*’ indicates the egg hatch rate (%) differ significantly between two whitefly species.

2.3.2 高温对两种粉虱伪蛹羽化的影响

在 37-45℃ 的温度范围内, 两种粉虱的伪蛹暴露相同的时间, B 型烟粉虱伪蛹的羽化率要显著高于温室粉虱伪蛹(图 2-2)。B 型烟粉虱伪蛹在 37℃ 下暴露 1-6h, 羽化率从 91.4% 下降到 66.1%; 温室粉虱伪蛹的羽化率从 76.3% 下降到 41.1%。在 39℃ 暴露 1-6h, B 型烟粉虱伪蛹的羽化率与其在 37℃ 下的羽化率相似, 只略有降低。这表明在 37℃ 和 39℃ 下, 暴露时间的作用要大于温度的作用; 在 41℃ 和 43℃ 下也表现出相似的现象。而温室粉虱伪蛹在 39-45℃ 下处理相同的时间, 羽化率下降的非常快。

高温和暴露时间对 B 型烟粉虱伪蛹的存活都有显著影响(温度: $F_{(4,180)} = 135.64, P < 0.0001$; 时间: $F_{(3,180)} = 140.88, P < 0.0001$)。温度和暴露时间对 B 型烟粉虱伪蛹的存活的交互效应不显著($F_{(12,180)} = 0.844, P = 0.605$), 暴露时间的效应要高于温度($\text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.83 > \text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.70$)。高温对温室粉虱伪蛹的存活的影响显著($F_{(4,180)} = 278.10, P < 0.0001$), 暴露时间对温室粉虱伪蛹的存活影响亦显著($F_{(3,180)} = 117.06, P < 0.0001$); 其中温度的效应要高于暴露时间的效应($\text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.86 > \text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.66$); 温度和时间对温室粉虱的存活具有明显的交互作用($F_{(12,180)} = 5.36, P < 0.0001$)。两种粉虱伪蛹的耐热性存在显著性差异($F_{(1,360)} = 1371.27, P < 0.0001$)。

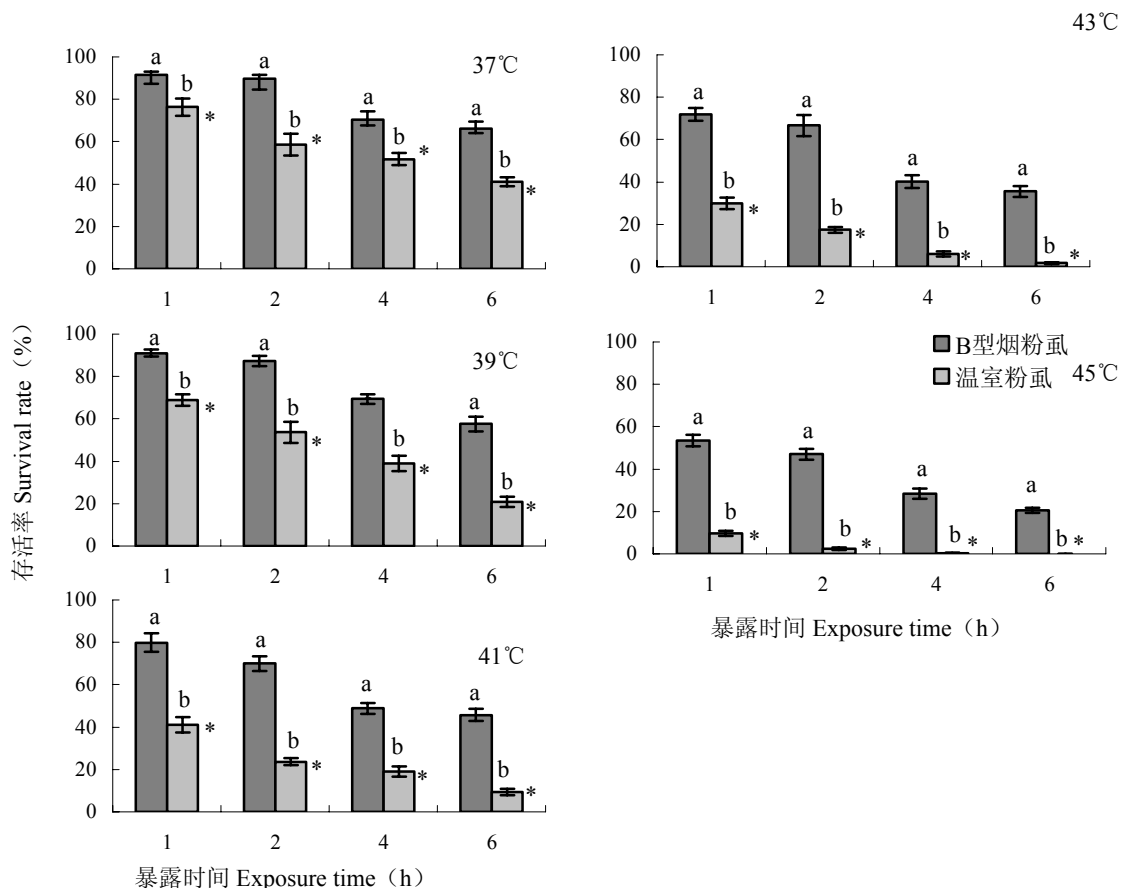


图 2-2 B 型烟粉虱和温室粉虱伪蛹经过高温暴露后存活率 (%)。柱上不同字母表示同种粉虱伪蛹暴露不同时间后的存活率在 0.05 水平存在显著差异; ‘*’表示两种粉虱伪蛹的孵化率之间存在显著差异。

Fig. 2-2 Red-eye nymph survivals of *B. tabaci* B-Biotype and *T. vaporariorum* after exposure to high temperatures. Different letters above error bars indicate the survival rate (%) differ significantly at $P \leq 0.05$ level for each whitefly species; the ‘*’ indicates the survival rate (%) differ significantly between two whitefly species.

2.3.3 高温对两种粉虱成虫存活的影响

B 型烟粉虱和温室粉虱成虫对高温的反应不同(图 2-3)。在 37-45℃ 范围内暴露 1-6h, 温室粉虱和成虫的存活率明显低于 B 型烟粉虱。39℃ 以上的高温能够导致温室粉虱成虫的存活率迅速下降, 在 39℃ 下暴露 4h, 存活率为 51.1%, 暴露 6h, 存活率为 32.8%; 而 B 型烟粉虱成虫在 39℃ 下暴露 6h 以后, 基本上还可以全部存活; 在 41℃ 下处理 6h, B 型烟粉虱成虫的存活率还在 85% 以上, 温室粉虱成虫的存活率仅有 13.7%。43℃ 及以上高温能导致 B 型烟粉虱成虫的死亡率急剧上升, 随着暴露时间的延长, 4h 以后 B 型烟粉虱成虫存活率大约是 30%, 而温室粉虱存活率不足 10%。45℃ 条件下, 暴露不到 4h 可以导致温室粉虱全部死亡, 暴露不到 6h 可导致 B 型烟粉虱成虫的迅速死亡。

高温对 B 型烟粉虱成虫存活的作用效果显著 ($F_{(4,180)} = 1445.29, P < 0.0001$); 暴露时间作用亦显著 ($F_{(3,180)} = 205.10, P < 0.0001$); 其中温度的效应要高于处理时间的效应 ($\text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.97 > \text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.77$)。暴露温度和时间对 B 型烟粉虱成虫存活存在显著的交互作用 ($F_{(12,180)} = 75.69, P < 0.0001$)。高温对温室粉虱成虫存活的影响显著 ($F_{(4,180)} = 918.31, P < 0.0001$), 处理时间对温室粉虱成虫的影响亦显著 ($F_{(3,180)} = 354.84, P < 0.0001$); 其中温度的效应要高于时间的效应 ($\text{Eta}^2_{\text{温度}} 0.95 > \text{Eta}^2_{\text{时间}} 0.86$); 温度和时间对温室粉虱成虫存活的影响具有明显的交互作用 ($F_{(12,180)} = 27.90, P < 0.0001$)。两种粉虱的耐热性存在显著差异 ($F_{(1,360)} = 2058.26, P < 0.0001$)。

2.3.4 两种粉虱不同虫态耐热性比较

在 37℃ 和 39℃ 下暴露 1-6h 后, B 型烟粉虱成虫的存活率均在 90% 以上, 要显著高于卵和伪蛹的存活率。但卵和伪蛹的存活率之间不存在显著差异。当温度上升到 43℃ 和 45℃ 时, B 型烟粉虱成虫的存活率下降的很快, 要显著于其他两个静止虫态—卵和伪蛹。例如, 在 45℃ 下暴露 1h, 成虫的存活率为 42.6%, 暴露 6h 后成虫全部死亡; 但仍有 13.6% 和 20.5% 的卵和伪蛹能够存活。

根据多因素方差分析, B 型烟粉虱 3 个不同虫态之间的存活率存在显著差异 ($F_{(2,540)} = 51.93, P < 0.0001$), 暴露温度和时间的作用显著(温度: $F_{(4,540)} = 941.51, P < 0.0001$; 时间: $F_{(3,540)} = 581.01, P < 0.0001$)。不同虫态、温度以及时间之间的交互作用显著(虫态*温度: $F_{(8,540)} = 89.10, P < 0.0001$; 虫态*时间: $F_{(6,540)} = 13.89, P < 0.0001$; 温度*时间: $F_{(12,540)} = 29.43, P < 0.0001$; 虫态*温度*时间: $F_{(24,540)} = 10.14, P < 0.0001$)。

在 37℃ 下暴露 1-6h 后, 温室粉虱卵和成虫的存活率之间没有显著差异, 但都显著高于伪蛹。在 39℃ 及以上温度, 温室粉虱 3 个虫态随着温度的升高和暴露时间的延长, 存活率下降的都快。尤其是当温度上升到 43℃ 和 45℃ 时, 温度对 3 个虫态存活的影响更为显著。例如, 伪蛹和成虫在 43℃ 下暴露 6h 或是在 45℃ 下暴露 4h 后几乎没有伪蛹和成虫能够存活, 但是在相同的条件下, 仍有 8.8% 和 11.2% 的卵能够发育到下一虫态, 在 45℃ 下暴露 6h, 温室粉虱卵才能全部死亡。

根据多因素方差分析, 温室粉虱 3 个不同虫态之间的存活率存在显著差异 ($F_{(2,540)} = 397.30, P < 0.0001$), 暴露温度和时间的作用显著(温度: $F_{(4,540)} = 1248.31, P < 0.0001$; 时间: $F_{(3,540)} = 694.33, P < 0.0001$)。不同虫态、温度以及时间之间的交互作用显著(虫态*温度: $F_{(8,540)} = 34.99, P < 0.0001$;

虫态*时间: $F_{(6,540)} = 11.77, P < 0.0001$; 温度*时间: $F_{(12,540)} = 13.63, P < 0.0001$; 虫态*温度*时间: $F_{(24,540)} = 8.74, P < 0.0001$)。

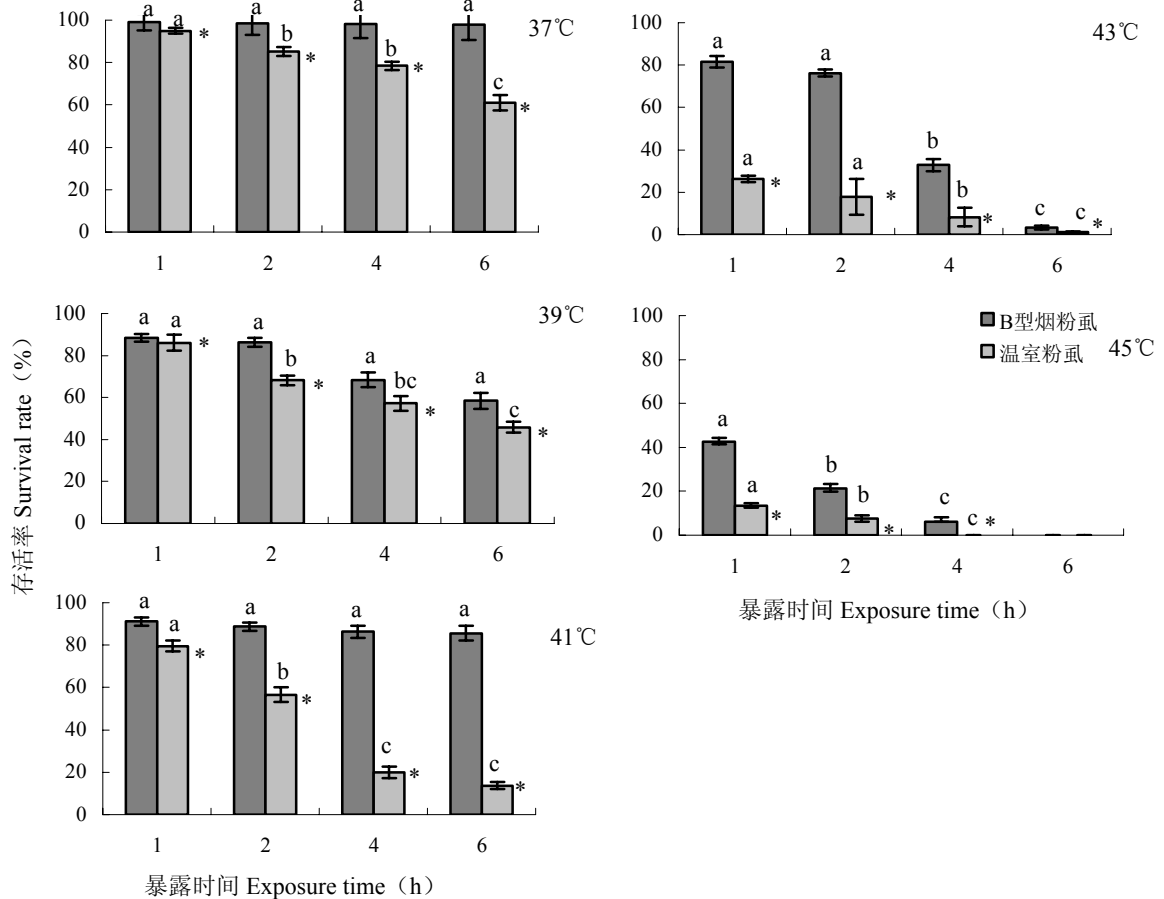


图 2-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经过高温暴露后存活率 (%)。柱上不同字母表示在 0.05 水平显著差异。

Fig. 2-3 Adult survivals of *B. tabaci* B-Biotype and *T. vaporariorum* after brief exposure to high temperatures.

Different letters above error bars indicate the survival rate (%) differ significantly at $P \leq 0.05$ level for each whitefly species; the '*' indicates the survival rate (%) differ significantly between two whitefly species.

2.3.5 两种粉虱不同性别成虫耐热性研究

B型烟粉虱和温室粉虱成虫在37°C下暴露1h, 存活率没有受到影响, 为100%; 在39°C或是更高的温度下暴露1h后, B型烟粉虱成虫的存活率下降(图2-4)。在37-45°C下暴露1h后, B型烟粉虱成虫的存活率在不同温度($F_{(4,42)} = 173.68, P < 0.0001$)间存在显著差异, 性别和暴露温度的交互作用显著 ($F_{(4,42)} = 3.93; P = 0.0085$)。温室粉虱也表现出相似的结果(高温: $F_{(4,46)} = 203.64, P < 0.0001$, 高温*性别 $F_{(4,46)} = 6.31, P = 0.0122$)。对B型烟粉虱和温室粉虱成虫的存活率和暴露温度间进行回归分析发现对于不同性别成虫二者关系均符合非线性模型 $y = 1/(a+be^x)$ (r^2 范围 0.9659-0.9970, $P < 0.0001$)。

B型烟粉虱在39°C和41°C下暴露1h后, 雌虫的存活率略高于雄虫, 但没有达到显著差异(39°C: $F_{(1,10)} = 4.79, P = 0.0535$; 41°C: $F_{(1,8)} = 2.87, P = 0.1288$)。当暴露温度上升到43°C和45°C时, 雌虫

的成活率分别为71.3%和24.9%，雄虫的存活率分别为46.1%和1.6%，雄虫的存活率降低的要显著快于雌虫（43℃: $F_{(1,8)} = 10.54$; $P = 0.0017$; 45℃: $F_{(1,8)} = 16.61$; $P = 0.0036$ ）。在39-45℃，温室粉虱成虫的存活率下降得很快，雌虫的存活率要显著高于雄虫($F_{(1,8-12)} = 5.85$, $P = 0.0419-0.0001$)。

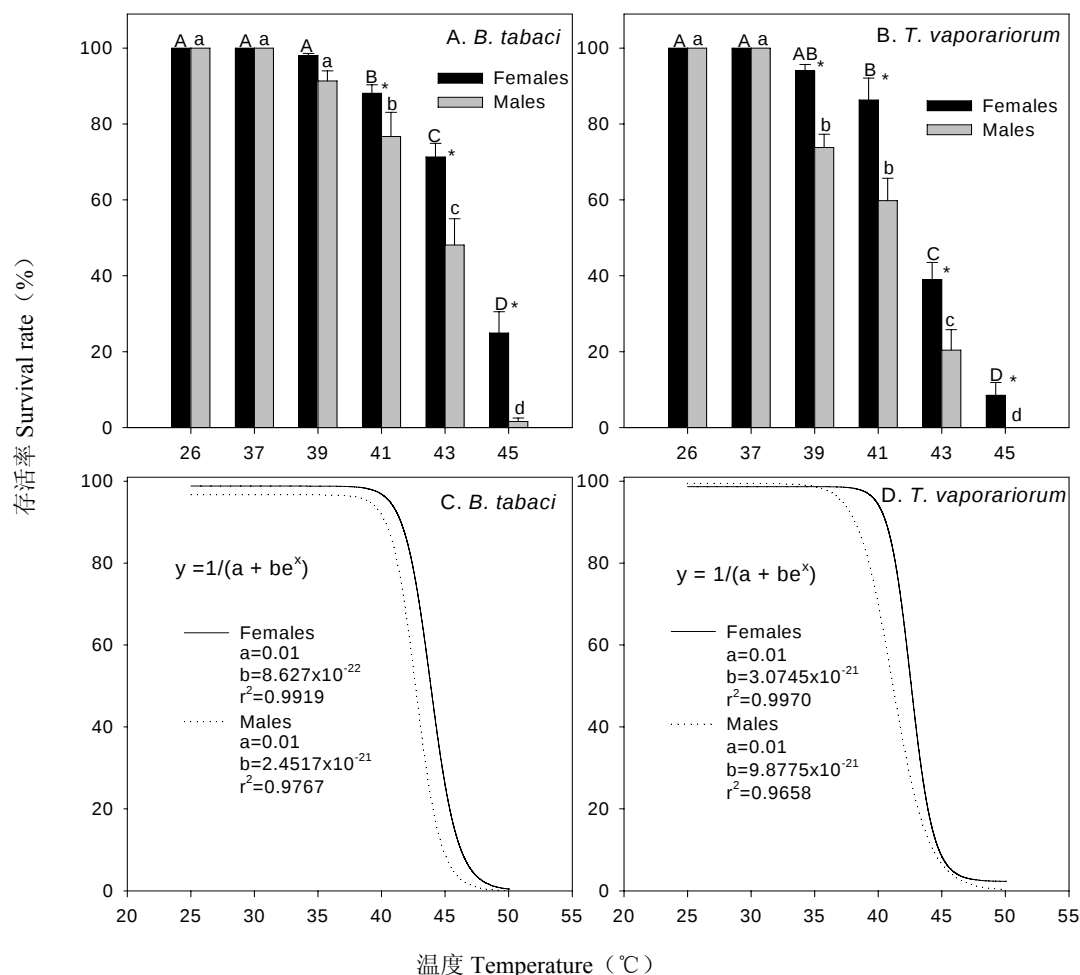


图 2-4 B 型烟粉虱和温室粉虱不同性别成虫经过高温暴露后存活率(%)。在 A 和 B 中，柱上不同大写字母表示雌虫在 6 种温度下的存活率在 0.05 水平显著差异；不同小写字母表示雄虫存在显著差异；‘*’表示雌雄虫之间存在显著差异。

Fig. 2-4 Adult survivals (%) of *B. tabaci* B-Biotype and *T. vaporariorum* after heat shock for 1h. In A and B, the upper case letters over the bars indicate the survival rates at the six heat shock temperatures differ significantly at $P < 0.05$ for females, and the lower case letter, for males for each whitefly species; the ‘*’ indicates that the survival rates differ significantly between females and males. In C and D, the curves show the relationship between heat-shock temperatures and survivals of female and male adults of the two whitefly species, and fit an nonlinear model, $y = 1/(a + be^x)$; where, y is survival rate (%), and x is heat-shock temperature.

2.3.6 高温驯化对两种粉虱耐热性的影响

非致死高温驯化可以显著的提高 B 型烟粉虱成虫对极端致死高温胁迫的抵抗力（图 2-5）。与对照相比，在 37℃ 驯化 30min 后 B 型烟粉虱成虫存活率由 44.0% 上升到 63.9%，存活率提高了近 20% ($t = -5.99, df=1, 18, P < 0.05$)。但对温室粉虱在 37℃ 驯化 30min 对其在 43℃ 时的存活率影响不大，与对照相比存活率仅提高了 6.1% ($t = 1.60, df=1, 18, P=0.13$)。

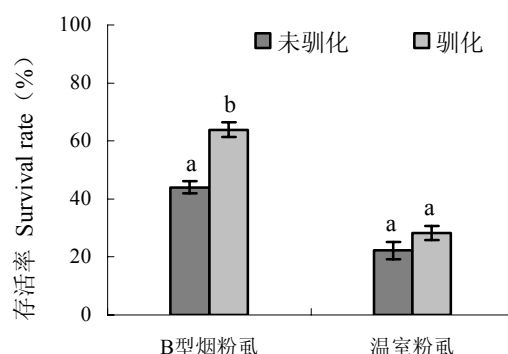


图 2-5 非致死高温驯化对 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫耐热性的影响

Fig. 2-5 Effect of acclimation at non-lethal high temperature for 30min on average survival of adults of *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum* after exposure to lethal high temperatures. Different letters above error bars indicate significant difference at 0.05 level.

2.4 小结与讨论

研究表明，在高温胁迫下，B型烟粉虱卵、伪蛹和成虫的存活能力都要显著高于温室粉虱。随着暴露时间的延长和暴露温度的升高，温室粉虱各虫态的死亡率都下降的比B型烟粉虱要快。特别是对伪蛹和成虫 2 个虫态，在 37℃ 仅暴露 1h，两种粉虱的存活率就存在显著差异；43℃ 和 45℃ 的高温对温室粉虱的致死作用则更为明显（图 2-1，2-2，2-3），在 45℃ 下暴露 4h，温室粉虱伪蛹和成虫就全部死亡，而B型烟粉虱在 45℃ 下暴露 4h 仍有成虫存活，暴露 6h 仍有伪蛹可以羽化。Tsueda and Koji（1998）研究也发现，B型烟粉虱在 30℃ 条件下存活率和发育历期分别要高于和短于温室粉虱，而在 20℃ 条件下情况正好相反，这也说明B型烟粉虱对高温的适应能力要强于温室粉虱。比较两种粉虱在我国的分布和危害不难发现，温室粉虱虽然在我国 22 个省市地区均有分布，但是主要在北方危害，北京、黑龙江、河北等地尤为严重。B型烟粉虱在我国北纬 19-44° 的地区均有报道，其自然种群还在进步扩散。我国地理范围南北跨越大，在南方温带、亚热带地区夏季炎热，对温带昆虫来说，具有抵抗炎热的能力是很重要的(Kimura et al., 1994)。B型烟粉虱是耐热性昆虫，具有高耐热性有利于其种群在炎热夏季发生。在我国北方，近 20 年来温室大棚发展迅速，为B型烟粉虱躲避冬天寒冷，安全越冬提供了条件，B型烟粉虱的连年积累也容易导致其大发生（张芝利，2000）。而温室粉虱对高温敏感，37℃ 的高温处理 1h，其存活率就显著下降。相比于B型烟粉虱，温室粉虱发展了对低温更适应的策略，相对较低的温度有利于其种群发展。这与温室粉虱在春秋气候较为凉爽的时候种群上升这一现象一致。因此，在我国南方某些地区（如广西），虽然有温室粉虱分布，但由于其在这些气候区适应能力弱，而B型烟粉虱对

高温的适应范围比较广，因此在传入后逐渐占领起原有生态位，并发展成为优势种群。但是温室粉虱对温度的适应性并不能完全解释其在我国的分布，应当还有其它的因素共同作用（如寄主植物适应性、种间竞争）决定了其在我国的分布。

研究还发现，两种粉虱不同性别成虫的耐热性也存在差异。随着温度的升高，两种粉虱雌雄虫的存活率均下降。但温室粉虱雌雄虫对高温的反应均比 B 型烟粉虱敏感。温室粉虱成虫在 39℃ 下暴露 1h，雌雄虫均表现出致死反应；而 B 型烟粉虱雌虫 41℃ 才开始表现。在 45℃ 下温室粉虱雌虫不能存活；而 B 型烟粉虱还有少量的雄虫生存下来。B 型烟粉虱和温室粉虱都可以营多种生殖方式，通过采用不同的生殖方式来调节后代的性比，进而调节种群的发展（Krainacker and Carey, 1988）。在短时间的高温作用下，B 型烟粉虱雌雄虫对高温的敏感性都低于温室粉虱，当雄虫比例下降或不能存活时，后代种群也就面临着衰退。

第三章 B 型烟粉虱和温室粉虱热胁迫生殖适应性研究

昆虫是变温动物，对温度非常敏感。在自然界中，昆虫常暴露在各种高温条件下，有时虽然不会导致昆虫的迅速死亡，但能在昆虫后来的发育阶段引起发育异常和缺陷，尤其是导致昆虫的生殖适应性降低，会影响到种群下一代的规模和繁殖基数，这种热胁迫的反应将会在后代的种群动态上得以反映（Denlinger et al., 1991; Yocum et al., 1994; Denlinger and Yocum, 1998）。

B 型烟粉虱和温室粉虱同为先后入侵我国的重要外来种，但在种群发生动态上存在较大差异。B 型烟粉虱在高温季节危害比较严重，种群数量大，持续时间长，并且更趋向于温室外危害；温室粉虱则主要在温室内危害，一般在春秋种群数量上升（吴孔明等，2001; Ramos et al., 2002; 罗晨等，2004）。由此可见，B 型烟粉虱和温室粉虱对高温的反应和适应过程不同。我们推测两者对温度特别是对高温的反应差异是造成它们种群动态存在差异的主要原因，而高温对两者生殖适应性影响的差异可能是导致该现象的直接原因。为此，我们将研究热胁迫对两种粉虱生殖适应性影响，期望从比较生物学的角度阐明这一生态学现象。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试昆虫和寄主植物

实验中所用的 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫均采自在温室中长期保持的实验种群。饲养 B 型烟粉虱和温室粉虱的寄主植物分别为棉花（泗棉 3 号）和菜豆（供给者）。实验中所用的寄主植物分别为两种粉虱的饲养植物。

3.1.2 热胁迫处理方法和饲养条件

热胁迫在人工气候箱中进行（型号：MHT-350，日本三洋电机股份有限公司），设置 5 个暴露温度，分别为 37℃、39℃、41℃、43℃和 45±0.2℃，处理时间为 1h。处理结束后，将粉虱转移到 26±0.5℃人工气候箱（型号：PRX-500D-30，中国宁波海曙赛福实验仪器厂）中，2h 后观察其存活情况，并取活的成虫进行观察对其生殖的影响，饲养条件为：26±0.5℃，相对湿度 60-70%，光周期 14:10h (L:D)。

3.1.3 热胁迫对 B 型烟粉虱和温室粉虱生殖适应性的影响

成虫寿命：采集新羽化的 B 型烟粉虱成虫于指形管，每管 1 头成虫。在解剖镜下辨别雌雄并按性别进行分组，然后热激处理 1h。处理结束后将粉虱放置在温度 26±0.5℃的人工气候箱中 2h，待成虫苏醒后取存活的粉虱用微虫笼（臧连生等，2005）接虫在棉花上，每个微虫笼中接 10 只同性别的成虫。然后将接好虫的寄主植物放置在 26±0.5℃，60%-70% RH，14:10h (L:D)的人工气候箱（型号：PRX-500D-30，中国宁波海曙赛福实验仪器厂）中饲养。24h 以后开始调查存活情况，

以后每隔 24h 调查一次, 记录每只成虫存活的时间, 直至成虫全部死亡。每个处理重复不少于 5 次。

产卵前期: B 型烟粉虱成虫采集和热激处理的方法同成虫寿命试验。处理结束后将粉虱放置在 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱中 2h, 待成虫苏醒后取存活的粉虱进行雌雄配对并用微虫笼接虫在棉花上, 每个微虫笼中接 1 对成虫。然后将寄主植物放置在 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60%-70% RH, 14:10h (L:D) 的人工气候箱中。24h 以后开始调查产卵情况, 以后每隔 24h 调查一次, 直至雌虫产卵。在调查过程中如果雄虫先死亡则补充雄虫。每个处理重复不少于 40 次。

产卵量: B 型烟粉虱成虫采集和热激处理的方法同成虫寿命试验。处理结束后取活的 B 型烟粉虱进行雌雄配对, 每个微虫笼中接 1 对成虫。然后用微虫笼将粉虱接在棉花上并将棉花放置在 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60-70%RH, 14:10 h (L:D) 的人工气候箱中。48h 以后开始调查粉虱产卵的情况, 并记录产卵量。以后每隔 2 天调查 1 次 (以减少人工操作对粉虱造成干扰), 直至雌虫死亡。在调查过程中如果雄虫先死亡则补充雄虫。每个处理重复不少于 10 次。

后代生存能力和性比: 采 B 型烟粉虱成虫采集和热激处理的方法同成虫寿命试验。处理结束后取存活的 B 型烟粉虱, 进行雌雄配对后用微虫笼接虫在棉花上, 每个微虫笼中接 5 对成虫 (雌: 雄=1: 1)。然后将棉花放置在 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60-70%RH 的人工气候箱中。5 天以后调查记录 B 型烟粉虱的产卵情况, 然后将带有卵的棉花放置在 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60-70%RH 的人工气候箱中。7 天后开始调查卵孵化的情况, 以后每隔 2 天调查 1 次直至再没有卵孵化出来。每次调查后, 棉花放回 $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60-70%RH 的人工气候箱中直到成虫羽化, 并调查记录成虫的羽化数以及雌雄比例。以上每个处理重复不少于 5 次。

3.2 数据处理

用单因素方差分析来检验不同热激温度处理后粉虱成虫的寿命、产卵前期、产卵量、孵化率、总存活率和后代性比差异。相同处理条件下两种粉虱成虫的产卵量、孵化率、总存活率和后代性比用 T-test 来检测两者之间是否有显著性差异。如果高温暴露后成虫的寿命短于 1 天或是产卵量为 0, 则不计入统计分析。以上数据分析用统计软件 SPSS 进行 (SPSS10.0, SPSS Inc., USA), 显著性检验水平均为 $P\leq 0.05$ 。

3.3 结果与分析

3.3.1 热胁迫对两种粉虱成虫寿命的影响

热激处理后 B 型烟粉虱和温室粉虱雌雄虫的寿命见表 3-1。在 $37-45^{\circ}\text{C}$ 下处理 1h 后, B 型烟粉虱雌虫的寿命与对照相比有所变化, 但是没有显著影响 ($F_{(5, 294)}=2.50, P=0.089$)。在 45°C 的高温下暴露 1h 后, B 型烟粉虱雄虫的平均寿命为 10.3d, 要显著低于对照下的 14.8d ($\text{df}=98, t=4.21, P<0.05$)。高温对温室粉虱不同性别成虫寿命的影响与对 B 型烟粉虱的相似。温室粉虱成虫在 $37-41^{\circ}\text{C}$ 范围内处理 1h 后, 雌雄虫的寿命要短于对照, 但没有显著差异 ($F_{(3, 196)}=1.96, P=0.122$); 在 43°C 处理 1h 后, 雌虫的寿命要显著短于对照 ($\text{df}=64.42, t=14.61, P<0.05$)。 43°C 以上的高温对温

室粉虱雄虫的影响比较大，在 43℃下处理 1h，雄虫的平均寿命仅有 1.5d；在 45℃下处理 1h，雄虫很快死亡，平均寿命不足 1d。

表 3-1 热胁迫后 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的寿命（天）

Table 3-1 The longevity of *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum* adults after brief exposure to high temperature

温度（℃） Temperature	B 型烟粉虱成虫寿命（天） Longevity of <i>B. tabaci</i> B-biotype (days)		温室粉虱成虫寿命（天） Longevity of <i>T. vaporariorum</i> (days)	
	雌虫 female	雄虫 male	雌虫 female	雄虫 male
26	20.9±0.8a	14.8±0.9a	15.6±0.7a	10.1±0.6a
37	20.2±0.9a	15.9±0.8a	14.5±0.5a	9.2±0.6a
39	18.8±1.0a	14.6±0.6a	14.3±0.4a	9.1±0.5a
41	17.3±1.2a	13.4±0.1a	13.9±0.4a	9.1±0.5a
43	17.0±1.2a	13.5±1.0a	3.9±0.3b	1.5±0.1b
45	17.4±1.1a	10.3±0.6b	< 1	< 1

表中数据为平均值±标准误，同列数据后标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$, S-N-K检验)。

The data in the table are mean ±SE and the means within the same column followed by different letters differ significantly by S-N-K test ($P < 0.05$)

3.3.2 热胁迫对两种粉虱成虫产卵前期和产卵量的影响

B型烟粉虱和温室粉虱成虫在不同温度下热激处理 1h后，平均产卵前期为 2.0-2.2d，与对照相比没有显著差异(B型烟粉虱: $F_{(5,238)}=1.17$, $P=0.326$; 温室粉虱: $F_{(4,200)}=0.094$, $P=0.984$)（表 3-2）。

在 37-45℃ 范围内暴露 1 h，对B型烟粉虱的产卵量没有显著影响 ($F_{(5,114)}=1.05$, $P=0.392$)。在 26℃时，平均每头雌虫产卵量为 92.5 粒；在 37-43℃ 的范围内暴露 1 h后，B型烟粉虱的产卵量由 97.6 粒下降到 67.2 粒，与对照之间也没有显著差异 ($F_{(4, 98)}=0.87$, $P=0.484$)；在 45℃下暴露 1 h，产卵量(105.5 粒/雌)与对照相比略有上升，但没有达到显著差异 ($df=21.73$, $t=-0.62$, $P=0.543$)

（图 3-1）。高温对温室粉虱产卵量有显著影响，在 37-45℃ 范围内暴露 1h，温室粉虱产卵量显著下降 ($F_{(5,57)}=100.07$, $P<0.05$)（图 3-1）。在 26℃时，平均每头雌虫的产卵量达到 77.4 粒；在 41℃暴露 1 h后雌虫产卵量下降到 42.1 粒；在 43℃暴露 1h后平均每头雌虫产卵量仅有 1.5 粒。在相同的条件下，B型烟粉虱的产卵量要高于温室粉虱。例如，在 41℃下暴露 1 h，B型烟粉虱和温室粉虱的产卵量分别为 74.3 和 42.1 粒，两者存在显著性差异 ($df=21.41$, $t=-2.07$, $P=0.050$)；在 43℃高温几乎完全抑制了温室粉虱的产卵，而B型烟粉虱的产卵量仍有 67.2 粒。根据双因素方差分析，温度对两种粉虱的产卵量影响有显著差异，高温对温室粉虱产卵量的影响要显著高于B型烟粉虱 ($F_{(1,170)}=33.37$, $P<0.05$)

表 3-2 热胁迫后 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的产卵前期

Table 3-2 The pre-oviposition period of adults of *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum* after brief exposure to high temperature

温度 (℃)	产卵前期 (天) Pre-oviposition period (day)	
	B 型烟粉虱 <i>B. tabaci</i> B-biotype	温室粉虱 <i>T. vaporariorum</i>
26	2.1±0.1a	2.1±0.1a
37	2.0±0.1a	2.1±0.1a
39	2.0±0.1a	2.1±0.1a
41	2.1±0.1a	2.2±0.1a
43	2.1±0.9a	2.1±0.1a
45	2.2±0.04a	—

表中数据为平均值±标准误，同列数据后标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$, S-N-K检验)。

The data in the table are mean ±SE and the means within the same column followed by different letters differ significantly by S-N-K test ($P < 0.05$)

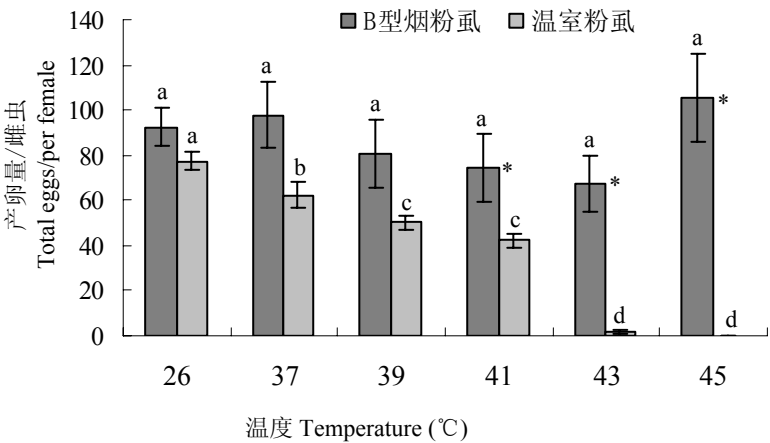


图 3-1 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫高温暴露后平均每雌虫一生产卵量。柱上不同字母表示同种粉虱在 6 种温度下暴露 1h 后的产卵量在 0.05 水平存在显著差异；‘*’表示两种粉虱产卵量之间存在显著差异。

Fig. 3-1 The total number of eggs laid by per female adult of *B. tabaci* B-biotype and *T.vaporariorum* after brief exposure to high temperature. Different letters above error bars indicate the number of eggs laid by adult differ significantly at $P < 0.05$ level for each whitefly species; the ‘*’ indicates the number of eggs differ significantly between two whitefly species.

3.3.3 热胁迫对两种粉虱后代生存能力的影响

B型烟粉虱雌雄成虫经过热激后，其后代卵的孵化率有一定的变化。在 37-41℃ 范围内，成虫经过热激处理 1h后，所产下卵的孵化率变化很小，且与对照均无显著差异（图 3-2）。但在 43℃

和 45℃ 下热激 1h 后, 其后代的孵化率与对照相比显著下降。例如, 在 26℃ 时, 成虫后代卵的孵化率为 90.8%, 在 43℃ 和 45℃ 热激 1 h 后成虫后代孵化率分别降到了 60.8% 和 51.8% (43℃: $df=8$, $t=3.74$, $P=0.006$; 45℃: $df=8$, $t=5.83$, $P=0.006$, $P<0.0001$)。在 26℃ 下, 温室粉虱卵的孵化率为 93.2%, 温室粉虱成虫在 39℃, 41℃ 下热激处理 1h, 温室粉虱成虫后代卵的孵化率分别降到 69.4%, 53.5%, 显著低于 26℃ 下卵的孵化率 (39℃: $df=11$, $t=5.13$, $P<0.0001$; 41℃: $df=11$, $t=8.79$, $P<0.0001$)。43℃ 下热激处理 1h 后, 温室粉虱后代卵不能孵化。根据方差分析, 温度对粉虱的后代孵化率影响显著 ($F_{(5, 55)}=92.92$, $P<0.0001$), 高温对温室粉虱产卵量的影响要显著高于 B 型烟粉虱 ($F_{(1, 55)}=19.57$, $P<0.0001$)。

B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经历短时间热激后其后代总的存活率与对照相比显著下降 (B 型烟粉虱: $F_{(5, 24)}=16.50$, $P<0.05$; 温室粉虱: $F_{(3, 23)}=8.34$, $P<0.05$) (图 3-3)。在 26℃ 下, 79.6% 的 B 型烟粉虱后代能够从卵一直存活到正常羽化; 在 41℃ 下热激 1h 后, 后代的总存活率下降到 52.3%, 在 43℃ 下热激 1h 后, 仅有 29.8% 的后代能够从卵一直存活到正常羽化, 与对照之间存在显著差异 (41℃: $df=8$, $t=3.58$, $P<0.05$; 43℃: $df=8$, $t=-6.97$, $P<0.05$)。热激处理对温室粉虱成虫后代生存能力的影响与热激处理对 B 型烟粉虱后代的影响相似。在 26℃ 下, 77.1% 的后代能够从卵一直存活到正常羽化, 在 39℃ 下热激处理 1h 后, 后代的总存活率下降到 52.3%, 在 41℃ 下热激 1h 后, 后代的总存活率为 37.0%, 与对照之间存在显著差异 (39℃: $df=$, $t=2.80$, $P<0.05$; 41℃: $df=11$, $t=-5.78$, $P<0.05$)。在相同的条件下, B 型烟粉虱经过热激处理后其后代总的存活率要高于温室粉虱, 但在 37-41℃ 下热激 1h, 高温对 B 型烟粉虱和温室粉虱后代总的存活率没有显著性差异 (37℃: $df=$, $t=11$, $P=0.909$; 39℃: $df=$, $t=9$, $P=0.294$; 41℃: $df=9$, $t=-0.528$, $P=0.087$); 在 43℃ 以上热激暴露 1h, 温室粉虱没有后代能从卵存活到成虫, 而 B 型烟粉虱在 45℃ 下处理 1h 后 25.1% 后代能存活至羽化。根据双因素方差分析, 温度对两种粉虱的后代总存活率影响有显著差异, 高温对温室粉虱的影响要显著高于 B 型烟粉虱 ($F_{(1, 55)}=19.57$, $P<0.05$)。对 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经过热激处理后其后代的成活率和暴露温度间进行曲线拟合, 发现两种粉虱成虫二者之间均符合直线关系 (表 3-3)。导致 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫后代 50% 个体死亡的温度分别为 40.7 和 39.1℃, 两者相差 1.6℃; 导致 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫后代 90% 个体死亡的温度相差 4.1℃。

表 3-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫经过高温暴露后代存活率与温度之间的回归分析

Table 3-3 Curve equation from regression between temperature and total survival rate (%) from egg to adult of F1 progeny that produced by the heated adults of *B. tabaci* B-biotype and *T.vaporariorum*.

粉虱种类	回归方程	R^2	P 值	Ltemp ₅₀ (℃)	Ltemp ₉₀ (℃)
B 型烟粉虱	$Y=305.68-6.28X$	0.96	0.004	40.7	47.1
温室粉虱	$Y=424.36-9.58X$	0.94	0.006	39.1	43.0

Y: 表示后代存活率(%); X: 表示温度。Y: survival rate (%); X: exposure temperature

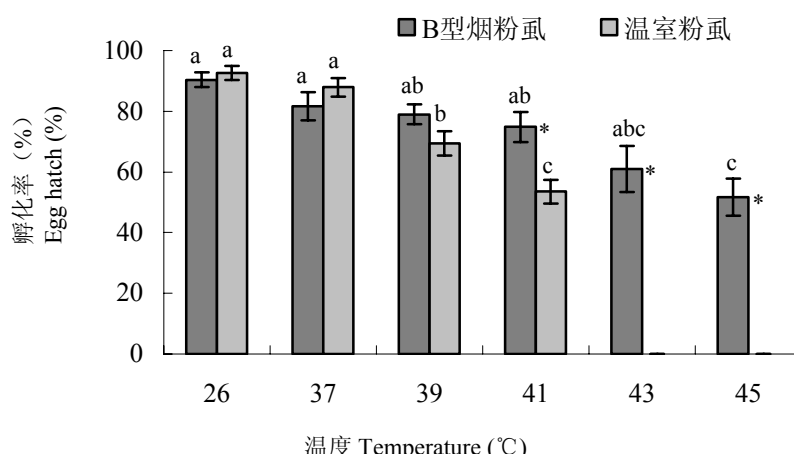


图 3-2 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代的卵孵化率。柱上不同字母表示同种粉虱在 6 种温度下暴露 1h 后 F1 代的卵孵化率在 0.05 水平存在显著差异；‘*’表示两种粉虱 F1 代的卵孵化率之间存在显著差异。

Fig. 3-2 The egg hatch rate (%) of F1 progeny that produced by the control and the heated adults of *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum*. Different letters above error bars indicate the egg hatch rate (%) of F1 progeny differ significantly at $P < 0.05$ level for each whitefly species; the ‘*’ indicates the egg hatch rate (%) of F1 progeny differ significantly between two whitefly species.

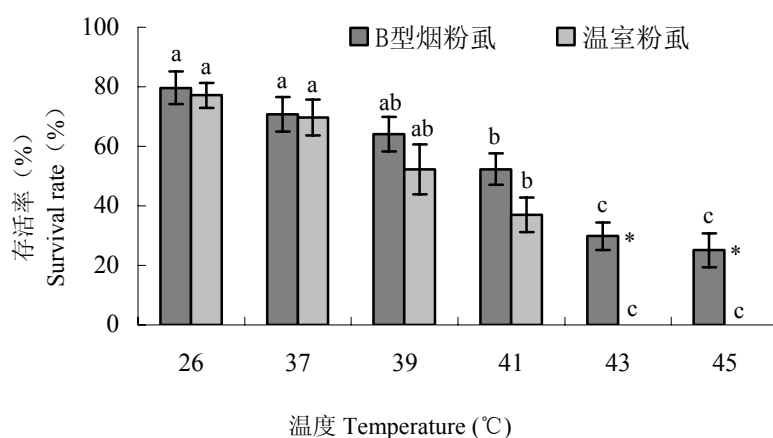


图 3-3 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代总存活率。柱上不同字母表示同种粉虱在 6 种温度下暴露 1h 后 F1 代存活率在 0.05 水平存在显著差异；‘*’表示两种粉虱 F1 代的存活率之间存在显著差异。

Fig. 3-3 Total survival rate (%) from egg to adult of F1 progeny that produced by the control and the heated adults of *B. tabaci* B-biotype and *T. vaporariorum*. Different letters above error bars indicate the total survival rate (%) of F1 progeny differ significantly at $P < 0.05$ level for each whitefly species; the ‘*’ indicates the total survival rate (%) of F1 progeny differ significantly between two whitefly species.

3.3.4 热胁迫对两种粉虱后代性比的影响

43℃以上的高温还会影响到 B 型烟粉虱成虫后代的性比（图 3-4）。在 37-41℃范围内，B 型

烟粉虱成虫热激 1h 后, 其后代的性比与对照相比差异不大, 雌虫的数量为总数的 50-64% 左右。而在 43℃ 和 45℃ 下热激 1h 后, 其后代的性比发生了逆转, 雌虫的比例下降, 雄虫的比例上升到 60% 以上。在 37-41℃ 范围内, 热激 1h 对温室粉虱成虫后代性比没有影响, 雌虫所占的比例一直保持在 54% 左右 (图 3-4)。

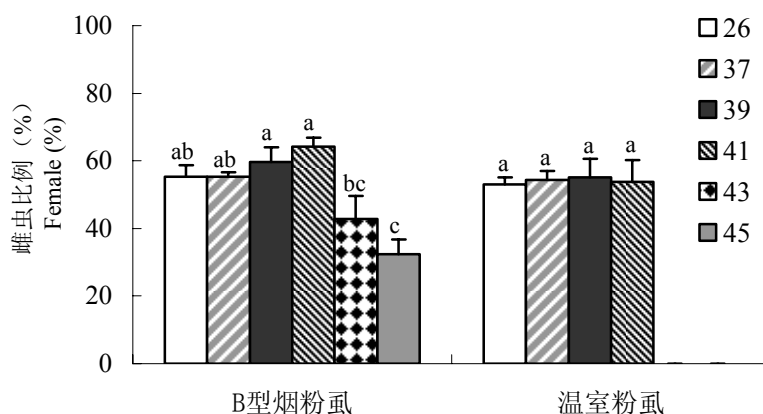


图 3-4 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫热胁迫后 F1 代雌虫所占比例 (%)。柱上不同字母表示在 0.05 水平显著差异。

Fig. 3-4 The percentage of females of F1 progeny that produced by the control and the heated adults. Different letters above error bars indicate significant difference at 0.05 level.

3.4 小结与讨论

研究结果表明, 短时间的高温暴露两种粉虱的生殖适应性都会产生影响, 但温室粉虱对高温更加敏感。在 37-45℃ 内热激处理 1h 后, 两种粉虱的产卵前期没有变化, 但是在成虫的寿命、产卵量、后代卵的孵化率、总存活率以及性比等方面存在明显不同。经过热激处理后, B 型烟粉虱雌虫的寿命和产卵量与对照相比没有显著差异; 而温室粉虱雌虫的寿命随着温度的升高而缩短, 45℃ 下处理 1h, 存活的时间不会超过 24h; 雌虫的产卵量也随着温度的升高而迅速下降, 在 43℃ 高温几乎完全抑制了温室粉虱的产卵, 且没有后代能够完成世代发育, 43℃ 应是温室粉虱种群存活的上限温度。温室粉虱成虫在 39℃ 热激 1h 后其后代的存活率与对照相比就显著下降, 而 B 型烟粉虱成虫要在 43℃ 及以上高温下热激才会出现相同的反应。

B 型烟粉虱和温室粉虱在自然界中常会受到高温的胁迫, 例如, 在有 B 型烟粉虱分布的美国西南部地区, 每天最高的气温通常都高于 40℃; 夏季田间温度通常都在 35℃ 以上, 甚至超过 40℃, 温室中的温度则会更高 (Skinner, 1996)。高温对粉虱生殖适应性的影响会影响到种群下一代的规模和繁殖基数, 并在其种群动态上表现出来。由于短时间的高温经历就可以导致温室粉虱存活率和生殖力的下降, 因此夏季高温会抑制温室粉虱种群的发展和大量发生。而 B 型烟粉虱对高温有较强的适应能力, 在 30℃ 以上的高温条件仍能保持较高存活率和较短的发育历期, 甚至在经历 45℃ 以上的高温后, 存活率仍超过了 40%, 并且保持较高的产卵量和存活率, 因此其种群在春季气温升高时会快速增长, 并在夏天高温季节大量发生, 成为优势种群。这与 B 型烟粉虱季节发生规律也相一致 (Tsueda and Koji, 1998; 吴孔明等, 2001; Ramos et al., 2002)。在我国北方, 冬季温室内的平均温度通常在 13℃ 以上, 烟粉虱在我国北方露地虽然不能安全越冬, 但在温室中仍

然能够存活，只是生长发育比较缓慢，这为来年春天种群的发展和扩散提供了虫源（郜庆炉等，2003；林克剑等，2004；陈艳华，2006）。而温室粉虱在24℃以下的温度完成1个世代所需的时间随着温度的升高而缩短，生长发育和繁殖特性也均高于B型烟粉虱（Tsueda and Koji, 1998；陈艳华，2006）。因此，在气温比较凉爽的春季和秋末，温室粉虱种群增长快于B型烟粉虱，容易上升为优势种群。由此可知，虽然B型烟粉虱对低温的适应性较低，但北方温室大棚和保护地的大力发展为其安全越冬提供了场所，同时在夏季高温干旱的季节B型烟粉虱在温室和露地都能很好的生存，因此容易造成其种群的逐年积累从而导致B型烟粉虱在我国北方地区大发生。

热激对温室粉虱后代性比没有影响，一直保持在 54%左右，这与前人的报道相一致（van Roermund and van Lenteren, 1992）。但 B 型烟粉虱成虫在比较温和的高温下（39℃和 41℃）热激 1h，其后代中雌虫的比例上升；经过 43℃及以上高温暴露后其后代性比产生逆转，雄虫所占的比例上升。田间观察发现，烟粉虱种群中雌雄虫性比与季节有关（Horowitz, 1986; Horowitz and Gerling, 1992）。室内研究也证明，温度对烟粉虱的性比变化有影响（Butler et al., 1986; Enkegaard, 1993）。对于一些能够进行产雄孤雌生殖的节肢动物来说，种群中性比的变化对种群的结构和发展具有重要的调节作用（Krainacker and Carey, 1988）。例如，在初春 B 型烟粉虱种群发展的早期，气温温和有利于产雌，雌虫在种群中占据优势有利于种群的快速建立和壮大；到了盛夏，白天的最高气温胁迫作用下雌虫所产生的后代中雄虫比例上升，使得种群出现衰退的趋势，到了秋末其种群优势又被温室粉虱所取代。

第四章 B 型烟粉虱和温室粉虱热激蛋白基因 hsp70 cDNA 片段克隆

热激蛋白（又称为热休克蛋白，heat shock proteins, HSPs）是最为人们所知的与耐热性相关的物质，其中 HSP70 在昆虫耐热性方面的作用最为突出（Velazquez et al., 1983; Feder et al., 1992; Krebs and Feder, 1997）。当昆虫受到高温胁迫时体内大量合成 HSP70，使其免受或降低高温的伤害。B 型烟粉虱是一种耐热性昆虫，常在夏季高温大量发生，甚至在日最高气温达到 50℃ 的美国南部的沙漠地区其种群也能生存发展（Wolfe et al., 1998）。目前对 HSP70 在 B 型烟粉虱抵抗高温胁迫中的作用还知之甚少，因此为了深入了解 B 型烟粉虱耐热机制，我们对 B 型烟粉虱热激蛋白基因 hsp70 cDNA 片段克隆；同时还克隆了其近缘种—温室粉虱的 hsp70 cDNA 片段，为今后探索两种粉虱的耐热机制奠定基础。

4.1 材料和方法

4.1.1 供试昆虫

实验中所用的 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫均采自在温室中长期保持的实验种群。饲养 B 型烟粉虱和温室粉虱的寄主植物分别为棉花（泗棉 3 号）和菜豆（供给者）。

4.1.2 主要仪器设备

- (1) PCR 扩增仪 (PTC-200) (美国 MJ Research 公司);
- (2) 高速冷冻离心机 (3K30 型) (SIGMA 公司);
- (3) 冰箱 (4℃、-20℃、-80℃) (SANYO 公司);
- (4) 电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司产品);
- (5) 紫外分光光度计 (Beckman Du 650 Spectrophotometer);
- (6) 洁净工作台、涡旋振荡器 (哈尔滨市东连电子技术开发有限公司)。

4.1.3 粉虱成虫总 RNA 的提取

4.1.3.1 主要试剂及其配制

- (1) Tris 碱, EDTA, DEPC, 溴化乙锭 (Amersco 公司);
- (2) 琼脂糖 (西班牙);
- (3) Trizol 试剂 (Invitrogen 公司);
- (4) 氯仿, 异丙醇, 无水乙醇, 硼酸国产;
- (5) 75%乙醇: 75 ml 无水乙醇+25 ml DEPC 处理水;
- (7) DEPC 处理水: 取水到无 RNase 的玻璃瓶中, 加入 DEPC, 使浓度为 0.01%, 室温下过夜, 高压蒸汽灭菌;
- (8) 0.5M EDTA: 18.61 g Na₂EDTA·12H₂O溶于 80 ml 双蒸水中, 用 NaOH 调节 pH 值到 8.0, 待完全溶解后定容到 100 ml, 然后高压蒸汽灭菌 30 分钟;

(9) 5×TBE(Tris-硼酸-EDTA): Tris 碱 54g, 硼酸 27.5 g, 5M EDTA 20ml, 溶解后用无菌蒸馏水定容到 1L, 使用前稀释成 0.5×TBE。

4.1.3.2 粉虱热激处理

取 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫各约 200 头, 在人工气候箱进行热激处理 1h, B 型烟粉虱和温室粉虱热激处理温度分别为 41℃和 39℃, 处理结束后将成虫在 26℃放置 1h, 然后用于提取总 RNA。

4.1.3.3 粉虱成虫总 RNA 的提取步骤

- (1) 将热激处理后的 B 型烟粉虱成虫迅速投入液氮中冷冻, 然后转入一个预先加有 200-300μl Trizol 试剂的 1.5ml 离心管中, 并用玻璃研磨杆进行充分研磨;
- (2) 加入 Trizol 试剂至 1ml, 涡旋混匀, 并在室温下静置 5 分钟;
- (5) 4℃, 12,000g 离心 10 分钟, 取上清;
- (6) 室温放置 5 分钟;
- (7) 加入 0.2 ml 氯仿, 用手充分震荡 15 秒, 室温下放置 2-3 分钟;
- (8) 4℃, 12,000g 离心 15 分钟 (匀浆液出现分层, 上层 RNA; 中间层蛋白质; 下层 DNA);
- (9) 取上清, 加入等体积异丙醇, 用手轻轻地混匀, 室温下放置 10 分钟
- (10) 4℃, 12,000g 离心 10-15 分钟;
- (11) 小心地倒去上清, 管底的白色沉淀即是 RNA, 注意不要将管底的沉淀同异丙醇倒出, 因此动作一定要轻柔;
- (12) 每管加入 1 ml 的 75%乙醇, 充分洗涤 RNA;
- (13) 4℃, 7,500g 离心 5 分钟;
- (14) 弃去上清, 室温干燥, 使乙醇完全蒸发;
- (15) 每管风干的 RNA 中加入 10-20μl DEPC 处理水, 待 RNA 沉淀完全溶解后, 保存于-80℃备用。

4.1.3.4 总 RNA 样品的质量检测和定量

- (1) 紫外检测: 取 2μl RNA 样品, 用 DEPC 处理水稀释到 50μl 后在紫外分光光度计下测定 A260、A280; 计算 A260/A280 及 RNA 浓度。

RNA 浓度 (μg/μl) = A260 × 40 × 稀释倍数。

RNA 样品 A260/A280 的比值应该在 1.8-2.0 之间。若 A260/A280 < 1.8, 溶液中蛋白或者其他有机物的污染比较明显; A260/A280 > 2.2 时, 说明 RNA 已经水解成单核酸。

- (2) 1%琼脂糖凝胶电泳检测

电泳的目的是在于检测 28S 和 18S 条带的完整性和他们的比值。一般来讲, 如果 28S 和 18S 条带明亮、清晰、条带锐利 (指条带的边缘清晰), 并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上, 则认为 RNA 的质量是好的。

4.1.4 反转录合成第一链 cDNA

4.1.4.1 主要试剂

cDNA 反转录用 Invitrogen 公司生产的 SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒, 在 PCR 仪上进行。

4.1.4.2 操作步骤

- (1) 将试剂从冰箱取出在冰上解冻, 用前混匀并简易离心;
- (2) 每个反应取 4-5 μ l(≤ 5 ng)总RNA于 0.2ml离心管中, 然后加入 10mmol/L dNTP和Oligo(dT)₁₂₋₁₈各 1 μ l, 用DEPC处理水补足到 10 μ l后轻轻混匀;
- (3) 65℃温浴 5 分钟, 然后置于冰上值至少 1 分钟, 稍微离心甩一下;
- (4) 加入 9 μ l按以下体系准备反应混合液: 10 $\times$ RT buffer 2 μ l, 25mmol/L MgCl₂4 μ l, 0.1mol/L DTT 2 μ l, RNase Inhibitor1 μ l, 然后轻轻混匀, 简易离心;
- (5) 42℃保温 2min;
- (6) 每个反应加入 1 μ l (50units / μ l) SuperScript II RT, 混匀;
- (7) 42℃保温 50min;
- (8) 70℃15min, 取出样品置于冰上;
- (9) 简易离心收集反应液, 每个反应加入 1 μ l Rnase H, 37℃温浴 20min;
- (10) 将反转录后的 cDNA 样品保存于-20℃或-80℃备用

4.1.5 引物设计

4.1.5.1 hsp70 引物设计

根据已知昆虫 hsp70 基因的核苷酸序列设计引物分别用于 B 型烟粉虱和温室粉虱 cDNA 片段扩增(王海鸿, 2005)。

B 型烟粉虱 hsp70 基因扩增引物 (S1—P1, 括号内为简并引物):

S1: 5' -ACAGTGCC(TC)GCGTA(TC)TTCAA-3' 共 20 个碱基;

P1: 5' -ACGCCGCTG(CA)GT(TC)TCAAT-3' 共 20 个碱基。

温室粉虱 hsp70 基因扩增的引物 (S2—P2; S3—P3):

S2: 5' -CCAGGAGTTCAA ACGCAAGTAC-3' 共 22 个碱基;

P2: 5' -CCCATAAGCAACAGCTTCATC-3' 共 21 个碱基。

4.1.6 粉虱 hsp70 cDNA 片段 RT-PCR 扩增

4.1.6.1 主要试剂

- (1) Taq 酶 (配有 10 $\times$ PCR buffer), 10mmol/L dNTPs, (NEB 公司);
- (2) DNA Loading Buffer, (Takara 公司)。

4.1.6.2 操作步骤

以两种粉虱的 cDNA 第一链为模板, 分别用相对应的目的基因引物扩增 hsp70 基因 cDNA 片段。PCR 反应体系为 10 $\times$ PCR buffer5.0 μ l, 10mmol/L dNTPs1.5 μ l, 正反向引物 (10 μ M) 各 1.5 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, cDNA 2 μ l, 加水至 50 μ l, 轻轻混匀后离心, 然后放入 PTC-200PCR 仪中扩增。PCR 仪中运行程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 58℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 循环 40 次; 72℃延伸 10min。扩增完毕后, 取 8 μ l PCR 产物, 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 0.5 $\times$ TBE 缓冲液进行电泳检测, 电泳结果于凝胶成像系统观察分析。

4.1.7 PCR 产物回收纯化

PCR 产物经 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切胶, 用购自 TIANGEN 的琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化靶 cDNA 片段。

4.1.8 hsp70 cDNA 片段克隆

4.1.8.1 主要试剂及其配制

- (1) p MD18-T Vector (Takara 公司);
- (2) *E.coli*. DH5 α 感受态细胞、IPTG、X-Gal (Tiagen 公司);
- (3) LB 液体培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 氯化钠 10g, 加水混合, 用 NaOH 调节 PH 值至 7.0, 定容到 1L, 121℃ 高压灭菌 30min;
- (4) LB 固体培养基: 15g 琼脂粉溶于 1000ml LB 液体培养基中, 121℃ 高压灭菌 30min;
- (5) 氨苄青霉素贮液(50mg/ml): 1g 氨苄青霉素溶于 20ml 水中, 分装后-20℃ 保存;
- (6) 质粒提取采用的是 Tiagen 公司生产的质粒提取试剂盒。

4.1.8.2 连接

- (1) 在微型离心管中分别加入回收纯化后的 PCR 产物 0.1 pmol -0.3pmol 和 p MD18-T Vector 1 μ l, 加水补充到 5 μ l;
- (2) 加入 5 μ l (等量) 的 Ligation Solution I;
- (3) 16℃ 反应过夜。

4.1.8.3 转化

- (1) 取感受态细胞置于冰浴中, 解冻后轻轻悬浮感受态细胞;
- (2) 向 100 μ l 感受态细胞中加入目的 DNA 10 μ l (50 μ l 的感受态细胞能够被 1ng 超螺旋质粒所饱和), 轻轻旋转离心管以混匀内容物, 在冰浴中放置 30min;
- (3) 42℃ 水浴中放置 60-90 秒, 然后快速将管移到冰浴中, 使细胞冷却 2-3min, 该过程不要移动离心管;
- (4) 向每个离心管中加入 500 μ l 无菌 LB 培养基 (不含抗生素), 混匀后置于 37℃ 摇床振荡培养 45min (150 转/min);
- (5) 将离心管内容物离心, 倒去 300 μ l 上清后与 40 μ l 2%X-Gal 和 7 μ l 20%IPTG 混匀, 涂布 LB 固体平板 (含有 100 μ g/ml Amp)。37℃ 培养 12-16h;
- (6) 挑选阳性克隆接种到液体 LB 培养基 (含有 100 μ g/ml Amp) 中, 37℃ 摇床振荡过夜。

4.1.8.4 质粒 DNA 的提取

- (1) 取 1-5ml 过夜培养的菌液加入到离心管中, 13,000rpm 离心 1 分钟, 尽量吸除上清;
- (2) 向留有菌体的离心管中加入 250 μ l 溶液 P1, 使用移液枪或涡旋振荡器测地悬浮细菌细胞沉淀;
- (3) 向离心管中加入 250 μ l 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解 (温和地混合, 不要剧烈振荡, 以免污染基因组 DNA, 此时菌液应该变得清亮粘稠, 所用的时间不应超过 5min, 以免质粒受到破坏);
- (4) 向离心管中加入 350 μ l 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时会出现白色

絮状沉淀，13,000rpm 离心 10 分钟，用移液枪小心地将上清转移到另一个干净的离心管中，注意不要吸出沉淀（P3 加入后立即混合，以免产生局部沉淀，如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清）；

- （5）将所得的上清溶液转入过滤柱（过滤柱放入收集管中），13,000rpm 离心 2 分钟，小心地将离心后收集管中得到的溶液转移到干净的管中；
- （6）将上一步所得的溶液加入吸附柱 CB3 中（吸附柱放入收集管中），13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 中重新放入收集管中；
- （7）向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 去蛋白液 PD，13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 中重新放入收集管中；
- （8）向吸附柱 CB3 中加入 700 μ l 漂洗液 PW，13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 中重新放入收集管中；
- （9）向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 漂洗液 PW，13,000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液；
- （10）将吸附柱 CB3 中重新放入收集管中，13,000rpm 离心 2 分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，然后将吸附柱 CB3 置于室温数分钟，以彻底晾干吸附柱中残余的漂洗液；
- （11）将吸附柱 CB3 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-100 μ l 经过 65-70 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，13,000rpm 离心 1 分钟将质粒溶液收集到离心管中。

4.1.8.5 酶切检测及测序

酶切鉴定后，以确定产物的片段长度与插入的片段是否一致。确认后挑取与插入片段一致的菌株进行培养，将培养后的菌液进行测序。

4.1.8.6 序列分析

用 DNAMAN 和 Blast 进行蛋白质序列翻译和同源性比较。

4.2 结果与分析

4.2.1 两种粉虱成虫总 RNA 的提取和方法优化

B 型烟粉虱和温室粉虱虫体微小，提取总 RNA 存在一定困难。在提取过程中需要注意：首先，最好采用新采集的成虫提取总 RNA。其次，进行组织匀浆时，用液氮将粉虱成虫冷冻 1-2 分钟后迅速转移到预先加入 200 μ l Trizol 试剂的离心管中在冰上进行研磨。此时若发现液体很粘，研磨杆能牵起丝状物，说明 Trizol 试剂的量太少，需在补加 Trizol 试剂继续研磨，以免会导致抽提的 RNA 中有较多的基因组 DNA 污染。研磨完样品后，将 Trizol 试剂补加到 1ml，震荡混匀后研磨液可以放置于 -80 $^{\circ}$ C 保存或是直接进行提取 RNA。

提取粉虱的总 RNA 后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果表明，18S、28S 明亮清晰、条带锐利，并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上（图 4-1）。紫外分光光度计检测表明 RNA 样品的 A260/A280 比值在 1.8-2.0 之间，RNA 的浓度大约为 0.7 μ g/ μ l 左右，说明提取的 RNA 的纯度和完整性得到很好的控制，亦说明用 Trizol 试剂适合 B 型烟粉虱总 RNA 的提取。

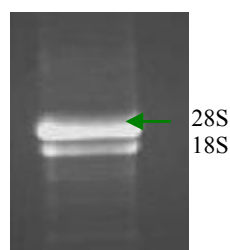


图 4-1 B 型烟粉虱总 RNA

Fig. 4-1 Total RNA isolation from *B. tabaci* B-Biotype

4.2.2 RT-PCR 扩增 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段

以 B 型烟粉虱 cDNA 为模板，用引物 S1 和 P1 扩增得到了一条分子量在 800bp 左右的特异性条带，与设计相符（图 4-2）。电泳回收纯化后，克隆到 p MD18-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5 α 得到重组子，挑取阳性克隆，经 Hind III 和 Xba I 酶切鉴定重组子中含有所需目的片段后，分别用 EcoR I 和 Pst I 双酶切和用 EcoR I 酶切，挑选酶切图具有代表性的克隆（图 4-3）测序，分别得到长度为 797bp、800bp 和 797bp 的三个片段，暂命名为 SB1，SB2，SB4。

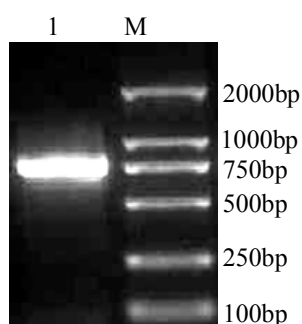


图 4-2 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 特异性扩增结果

Fig. 4-2 The result of RT-PCR amplification for *B. tabaci* B-biotype hsp70 partial cds. M: 标准分子量 DNA marker; 1: RT-PCR 扩增产物 RT-PCR product

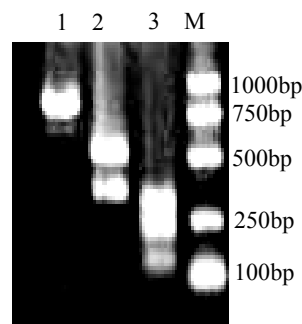


图 4-3 B 型烟粉虱 hsp70 基因 cDNA 片段重组质粒酶切鉴定

Fig. 4-3 Enzyme digestion analysis of the combinant plasmid DNA with *B. tabaci* B-biotype hsp70 partial cds
1,2,3: Recombinant plasmid DNA; M: 标准分子量 DNA marker

4.2.3 RT-PCR 粉虱扩增温室粉虱 hsp70 cDNA 片段

以温室粉虱 cDNA 为模板，用引物 S2 和 P2 扩增得到了一条分子量为 391bp 的条带，暂命名为 GT1；用引物 S3 和 P3 扩增得到了一条分子量为 181bp 的条带，暂命名为 GT2，与预期的片段大小都相吻合（图 4-4）。电泳回收纯化后，克隆到 p MD18-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5 α 得到重组子，挑取阳性克隆，经酶切鉴定重组子中含有所需目的片段后，挑选酶切图具有代表性的克隆（图 4-5）测序。

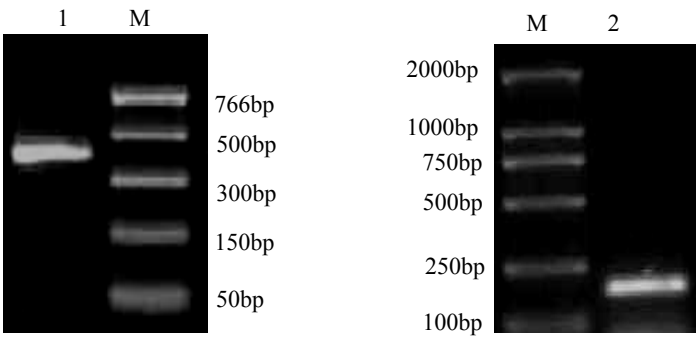


图 4-4 温室粉虱 hsp70 cDNA 特异性扩增结果

Fig. 4-4 The result of RT-PCR amplification for *T. vaporariorum* hsp70 partial cds

1, 2: RT-PCR 扩增产物 RT-PCR product; M: 标准分子量 DNA marker



图 4-5 温室粉虱 hsp70 cDNA 片段重组质粒酶切鉴定

Fig. 4-5 Enzyme digestion analysis of the combinant plasmid DNA with *T. vaporariorum* hsp70 partial cds.

1,2,3,4: Recombinant plasmid DNA; M: 标准分子量 DNA marker

4.2.4 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

(1)SB1 克隆

Total amino acid number: 265, MW=28446

Max ORF: 1-795, 265 AA, MW=28446

```
1      ACAGTCCCCGCGTATTTCAACGACTCACAGAGGCAAGCGACCAAAGATGCCGGTGCCATT
1      T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G A I

61     GCCGGACTCAATGTTTTGCGGATCATCAACGAGCCCACTGCCGCAGCCCTTGCCTATGGT
21     A G L N V L R I I N E P T A A A L A Y G

121    CTGGACAAGAACCTGAAAGGTGAGCGTAACGTTTTAATTTTCGACCTTGCCGGTGGCACA
41     L D K N L K G E R N V L I F D L G G G T

181    TTCGATGTCTCCATCTTGACAATTGATGAAGGCTCATTATTCGAAGTCCGTGCCACTGCT
61     F D V S I L T I D E G S L F E V R A T A
```

```

241      GGAGACACTCACCTTGGAGGCGAGGACTTCGACAATCGTCTTGTGAACCACCTAGCGGAG
81      G D T H L G G E D F D N R L V N H L A E

301      GAATTCAAACGCAAGTACCGTAAAGATCTTCGTGGCAACAACAGAGCACTCCGGCGTCTA
101     E F K R K Y R K D L R G N N R A L R R L

361      CGAACAGCTGCCGAGCGGGCCAAACGAACTCTTTCCTCCAGCACAGAGGCCAGCATCGAG
121     R T A A E R A K R T L S S S T E A S I E

421      ATCGATGCACTCGTGGATGGCATTGACTACTACACCAAAGTGTCCTGTCAGGTTGCGAA
141     I D A L V D G I D Y Y T K V S R A R F E

481      GAACTTTGCTCTGACCTCTTCCGCTCAACCCTCCACCCGGTTGAGAAAGCCCTGGCTGAC
161     E L C S D L F R S T L H P V E K A L A D

541      GCGAAAATGGGTAAAGGCTCCATTCATGATGTCGTCCTTGTAGGAGGCTCCACTCGCATT
181     A K M G K G S I H D V V L V G G S T R I

601      CCCAAGATCCAATCTTTGCTTCAGAACTTCTTCTGTGGAAAAACTCTAAACCTCTCTATC
201     P K I Q S L L Q N F F C G K T L N L S I

661      AACCCGGACGAAGCGGTGGCCTACGGAGCAGCAGTCCAGGCGGCAATTCTTAGTGGCGAC
221     N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D

721      ACCAGCTCAGCAATTCAAGATGTTCTCCTGGTGGACGTGGCGCCTCTATCTCTCGGCATC
241     T S S A I Q D V L L V D V A P L S L G I

781      GAAACAGCAGGCGGCGT
261     E T A G G

```

(2)SB2 克隆

Total amino acid number: 266, MW=29108

Max ORF: 1-798, 266 AA, MW=29108

```

1      ACAGTGCCTGCGTATTTCAATGATTCGCAGAGACAAGCCACAAAAGATTCAGGAGCTATC
1      T V P A Y F N D S Q R Q A T K D S G A I

61     GCTGGCTTGAATGTCCTTAGGATAATCAATGAACCTACAGCTGCTGCCATAGCGTATGGT

```

21 A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G

121 TTAGACAAGAAGGCCAGTGGATCTGGAGAGCGCAACGTCCTCATTTTTGACTTAGGTGGT

41 L D K K A S G S G E R N V L I F D L G G

181 GGTACTTTTGATGTATCTATCTTAACTATTGAAGATGGAATCTTTGAAGTCAAATCAACC

61 G T F D V S I L T I E D G I F E V K S T

241 GCAGGAGATACTCACCTGGGAGGAGAAGACTTCGATAATCGCATGGTGAATCACTTTGCC

81 A G D T H L G G E D F D N R M V N H F A

301 CAGGAGTTCAAACGCAAGTACAAGAAGGATCTCACGACCAACAAAAGAGCATTGAGGCGA

101 Q E F K R K Y K K D L T T N K R A L R R

361 TTAAGAACAGCCTGTGAAAAGGCTAAGCGCATCCTCTCATCCTCTAGTCAAACCAGCATT

121 L R T A C E K A K R I L S S S S Q T S I

421 GAAATTGATTCTCTCTTTGAAGGTATCGACTTCTACACCTCCATCACCAGAGCTAGATTT

141 E I D S L F E G I D F Y T S I T R A R F

481 GAAGAATTAAATGCTGATCTCTTCAGATCAACCATGGAACCGGTTGAAAAGTCACTGCGT

161 E E L N A D L F R S T M E P V E K S L R

541 GATGCTAAGATGGACAAAGCACAGATCCATGATATCGTCTTGGTCGGTGGTTCACACGT

181 D A K M D K A Q I H D I V L V G G S T R

601 ATCCCCGTGTTCAAAAGTTACTGCAAGACTTCTTCAATGGTAAAGAACTGAATAAATCG

201 I P R V Q K L L Q D F F N G K E L N K S

661 ATCAATCCTGATGAAGCTGTTGCTTATGGGGCTGCTGTCCAGGCAGCTATCCTCCACGGA

221 I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L H G

721 GACAAATCTGAGGAAGTCCAGGACTTGCTGCTTCTTGATGTTACACCATTGTCTCTTGGT

241 D K S E E V Q D L L L L D V T P L S L G

781 ATTGAAACTGCAGGCGGCGT

261 I E T A G G

(3)SB4 克隆

Total amino acid number: 265, MW=28636

Max ORF: 1-795, 265 AA, MW=28636

```
1      ACAGTCCCCGCGTATTTCAACGACTCTCAGCGACAAGCTACCAAAGATGCAGGAGCTATC
1      T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G A I

61     ACAGGACTCAACGTTCTCCGCATCATCAATGAGCCCACAGCTGCAGCCCTTGCGTATGGC
21     T G L N V L R I I N E P T A A A L A Y G

121    TTGGACAAAAACCTCAAAGGGGAACGCAACGTTCTCATTTTCGATCTCGGTGGTGGCACA
41     L D K N L K G E R N V L I F D L G G G T

181    TTCGACGTCTCCATCCTTACAATTGACGAGGGCTCACTGTTTGAAGTGCATCGACTGCT
61     F D V S I L T I D E G S L F E V R S T A

241    GGCGACACACACCTCGGCGGTGAGGACTTCGATAACCGGCTTGTCACCACCTTTGTGGAG
81     G D T H L G G E D F D N R L V N H F V E

301    GAATTCAAGCGTAAATATCGAAAAGATCTCCGAACCAACCCCGTGCTCTCAGAAGACTT
101    E F K R K Y R K D L R T N P R A L R R L

361    CGCACAGCAGCAGAGCGGGCCAAAAGAACATTGTCCTCAAGTACCGAAGCCAGCATTGAA
121    R T A A E R A K R T L S S S T E A S I E

421    ATTGACGCTCTGATGGATGGCATCGACTACTACACCAAGGTCTCAAGAGCGCGATTTGAA
141    I D A L M D G I D Y Y T K V S R A R F E

481    GAACTTTGTGCAGACTTATTCCGCTCGACTCTACATCCTGTCGAGAAAGCTCTCAACGAT
161    E L C A D L F R S T L H P V E K A L N D

541    GCCAAAATGGACAAAGGCTTAATCCATGATGTTGTGTTGGTTGGAGGCTCCACGCGAATT
181    A K M D K G L I H D V V L V G G S T R I

601    CCCAAAGTTCAATCTCTTCTCCAGAACTTCTTCGGTGGAAAACTCTGAATCTTTCCATC
201    P K V Q S L L Q N F F G G K T L N L S I

661    AACCTGATGAAGCCGCGGCTTACGGAGCAGCAGTTCAAGCAGCGATTCTCAGCGGTGAT
221    N P D E A A A Y G A A V Q A A I L S G D
```

```

721      ACCAGCTCAGCTATCCAAGATGTTCTCCTTGTCGACGTAGCACCCCTCTCACTTGAATT
241      T S S A I Q D V L L V D V A P L S L G I

781      GAAACAGCAGGCGGCGT
261      E T A G G

```

4.2.5 B 型烟粉虱和其它不同物种 hsp70 cDNA 序列同源性比较

对SB1、SB2和SB4号克隆的插入序列在GenBank中进行Blastn比对，查询结果为70KDa的hsp。在核苷酸水平上，3个基因片段核酸序列差异很大（图4-6）。其中SB1和SB4同源性为79%；SB1和SB2，SB4和SB2的同源性分别为67%和68%。SB1与B型烟粉虱hsp70 R1号克隆的同源性达到99%；SB2号克隆核苷酸序列与B型烟粉虱hsp70 M7号克隆的同源性达到99%；SB4与B型烟粉虱712 hsp70-like序列的同源性为92%（图4-7）。与昆虫纲的其他昆虫进行比较，SB1与家蚕（*Bombyx mori*）hsp70的同源性为77%；SB2与蝗虫（*Locusta migratoria*）hsp70部分序列同源性高达79%；SB4与淡色库蚊（*Culex pipiens*）同源性较高，为74%。

SB1	ACAGTGCCCGCGTATTTCAACGACTCACAGAGGCAAGCGA	40
SB2	-----t-----t--t--g-----a-----c-	40
SB4	-----t---c-a-----t-	40
SB1	CCAAAGATGCCGGTGCCATTGCCGGACTCAATGTTTTGCG	80
SB2	-a-----t-a--a--t--c--t--ct-g-----cc-ta-	80
SB4	-----a--a--t--ca-a-----c---c-c--	80
SB1	GATCATCAACGAGCCCACTGCCGCAGCCCTTGCCTATGGT	120
SB2	---a-----t--a--t--a--t--t---a-a--g-----	120
SB4	c-----t-----a--t-----g-----c	120
SB1	CTGGACAAGAACCTGAAA.....GGTGAGCGTAACGTTT	154
SB2	t-a-----ggcc-gtggatct--a-----c-----cc	160
SB4	t-----a-----c-----g--a--c-----c	154
SB1	TAATTTTCGACCTTGGCGGTGGCACATTGATGTCTCCAT	194
SB2	-c-----t---t-a--t-----t--t--t-----a--t--	200
SB4	-c-----t--c--t-----c-----	194
SB1	CTTGACAATTGATGAAGGCTCATTATTCGAAGTCCGTGCC	234
SB2	---a--t-----a--t--aatc...--t-----aaat-a	237
SB4	-c-t-----c--g-----c-g--t-----g--at-g	234

SB1	ACTGCTGGAGACACTCACCTTGGAGGCGAGGACTTCGACA	274
SB2	--c--a-----t-----g-----a--a-----t-	277
SB4	-----c-----a-----c--c--t-----t-	274
SB1	ATCGTCTTGTGAACCACCTAGCGGAGGAATTCAAACGCAA	314
SB2	----ca-g-----t---t-t--cc----g-----	317
SB4	-c--g-----c-----t-t-t-----g--t--	314
SB1	GTACCGTAAAGATCTTCGTGGCAACAACAGAGCACTCCGG	354
SB2	----aag--g-----cacgac-----a-----t-ga--	357
SB4	a--t--a-----c--aac----cc-c-t--t---a-a	354
SB1	CGTCTACGAACAGCTGCCGAGCGGGCCAAACGAACTCTTT	394
SB2	--at--a-----ctgt--aaa---t--g--c-tc--c-	397
SB4	a-a--t--c-----a--a-----a----at-g-	394
SB1	CCTCCAGCACAGAGGCCAGCATCGAGATCGATGCACTCGT	434
SB2	-a---tct-gtc-aa-----t--a--t---t-t---t-	437
SB4	----a--t--c--a-----t--a--t--c--t--ga-	434
SB1	GGATGGCATTGACTACTACACCAAAGTGTCCCGTGCCAGG	474
SB2	t--a--t--c----t-----tcca-ca--a-a--t--a	477
SB4	-----c-----g--c--aa-a--gc-a	474
SB1	TTCGAAGAACTTTGCTCTGACCTCTTCCGCTCAACCCTCC	514
SB2	--t-----t-aaatg----t-----a-a-----a-gg	517
SB4	--t-----tg-a--t-a-----g--t--a-	514
SB1	ACCCGGTTGAGAAAGCCCTGGCTGACGCGAAAATGGGTAA	554
SB2	-a-----a--gt-a---cg---t--t--g----ac--	557
SB4	-t--t--c-----t--caac--t--c-----ac--	554
SB1	AGGCTCCATTTCATGATGTCGTCCTTGAGGAGGCTCCACT	594
SB2	--cacag--c-----a-----t-g--c--t--t-----a	597
SB4	-----ta--c-----t--gt-g--t-----g	594
SB1	CGCATTCCCAAGATCCAATCTTTGCTTCAGAACTTCTTCT	634
SB2	--t-----cgtg-t---aag--a--g--ag-----a	637
SB4	--a-----ag-t-----c-t--c-----g	634

SB1	GTGGAAAACTCTAAACCTCTCTATCAACCCGGACGAAGC	674
SB2	a---t---gaa--g--taaa--g-----t--t--t-----	677
SB4	-----g--t--t--c-----t--t-----	674
SB1	GGTGGCCTACGGAGCAGCAGTCCAGGCGGCAATTCTTAGT	714
SB2	t--t--t--t--g--t--t-----a--t--c--ccac	717
SB4	c-c---t-----t--a--a--g-----c--c	714
SB1	GGCGACACCAGCTCAGCAATTCAAGATGTTCTCCTGGTGG	754
SB2	--a----aatctgag-a-g-c--g--ct-g--g--tc-t-	757
SB4	--t--t-----t--c-----t--c-	754
SB1	ACGTGGCGCCTCTATCTCTCGGCATCGAAACAGCAGGCGG	794
SB2	-t--ta-a--at-g-----t--t--t-----t-----	797
SB4	----a--a--c--c--a--t--a--t-----	794
SB1	CGT	797
SB2	---	800
SB4	---	797

图 4-6 B 型烟粉虱不同 hsp70 部分核苷酸序列的比对。破折号指出与最上一行核苷酸相同。

Fig. 4-6 Alignment of partial hsp70 nuclear acid sequences of *B. tabaci* B-biotype. The dashes indicate identity to the nuclear acid in the top line.

利用 DNAMAN 软件对 SB1、SB2 和 SB4 推导的氨基酸序列进行比对, 结果表明与已知的昆虫 HSP70 家族的氨基酸序列之间相似程度很高(图 4-8; 4-9), 并且都含有 HSP70 家族的 3 个签名序列(IDLGTTYS (该序列未包括)、IFDLGGGTFDVSL、VLVGGSTRIP) 中的 2 个, 初步判定均为编码 HSP70 蛋白的基因片段。

在氨基酸水平, SB1 和 SB4 同源性高达 95%, 与已经报道的烟粉虱的 HSP70 同源性达到 93%, 与昆虫纲中其他昆虫进行比对, SB1 和 SB4 与果蝇的同源性非常高, 其中与 *D. melanogaster* hsp68 同源性最高, 达 91%, 和苹果实蝇 (*Rhagoletis pomonella* Walsh) 及葱蝇 (*Delia antiqua*) HSP70 也是 90% 同源。SB2 与已经报道的烟粉虱的 HSP70 同源性达到 100%, 二化螟 (*Chilo suppressalis* Walker) HSC70, 甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae* (L.)) HSC70 的同源性达到 95%, 与 SB1 和 SB4 的氨基酸序列差别较大, 同源性为 75%。

因为 HSP70 家族分为胁迫诱导型(称 HSP70)和组成表达型(称 HSC70), 且每一类型的蛋白在不同物种中相似程度很高, 超过了同一物种内不同类型蛋白之间的相似程度。因此对这三个片段与已知的 hsp70 和 HSC70 进行同源性分析(图 4-8), 初步认定 SB1 和 SB4 号克隆属于诱导型 HSP70, 而 SB2 可能属于组成型 HSC70。

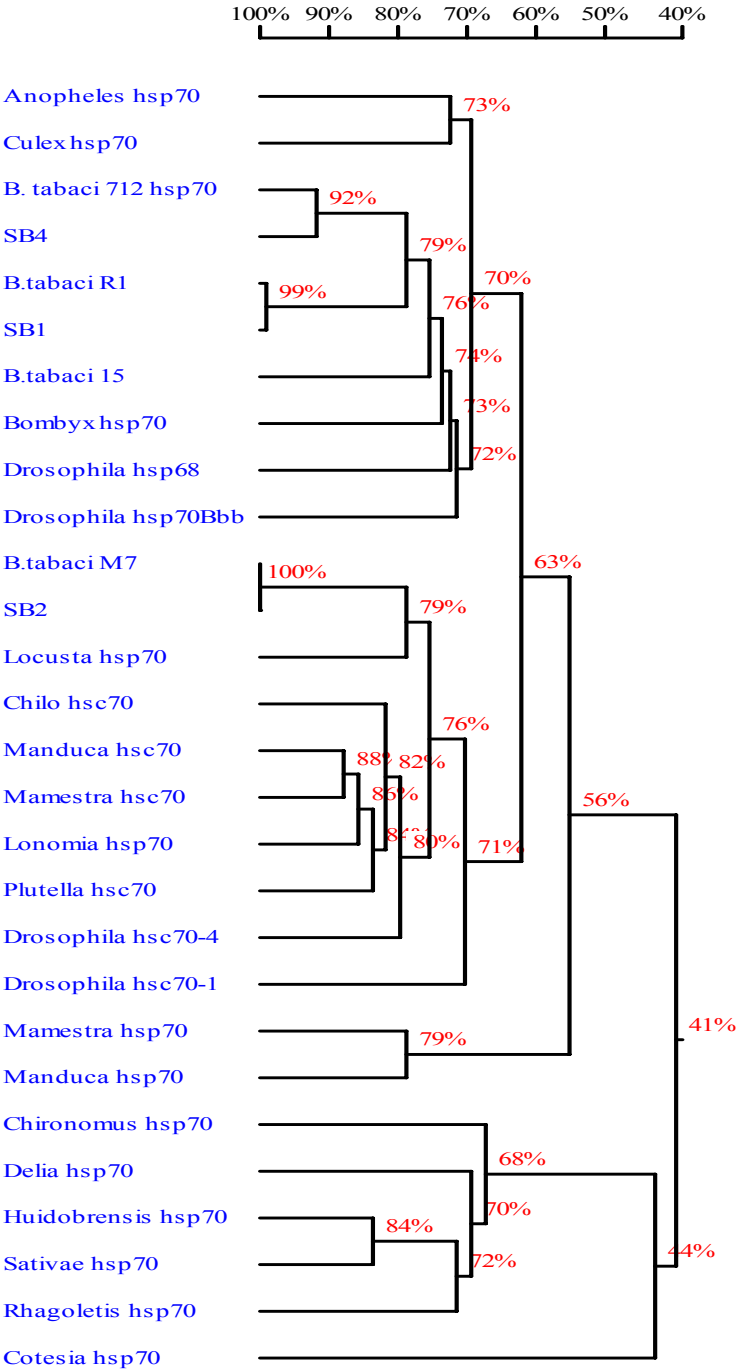


图 4-7 B 型烟粉虱及其它昆虫 hsp70 核苷酸序列同源性比较

Fig 4-7 Homology analysis on the hsp70 nucleic acid sequences of *B. tabaci* B-biotype and other insects.

Abbreviation: Anopheles=*Anopheles albimanus*, Bombyx=*Bombyx mori*, Chilo=*Chilo suppressalis*, Cotesia=*Cotesia rubecula*, Culex=*Culex pipiens*, Delia=*Delia antique*, Drosophila=*Drosophila melanogaster*, Locusta=*Locusta migratoria*, Lonomia=*Lonomia oblique*, Manduca=*Manduca sexta*, Mamestra=*Mamestra brassicae*, Plutella=*Plutella xylostella*, Rhagoletis=*Rhagoletis pomonella*, Sativae=*Liriomyza sativae*, Huidobrensis = *L. huidobrensis*

B.tabaci HSP70-15	TVPAYFNDNQATKDSGAIAGLNVLRI	28
B.tabaci HSP70	-a-----	28
SB1 protein	-a-----	28
SB2 protein	-a-----	28
SB4 protein	-a---t-----	28
B.tabaci HSP70-15	INEPTAAAIAYGLDKKASGSGERNVL IFDLGGGTFDVSIL	68
B.tabaci HSP70	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	68
SB1 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	68
SB2 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	68
SB4 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	68
B.tabaci HSP70-15	TIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAQEFKRKYK	108
B.tabaci HSP70	degsl.-----l---l-d-----	107
SB1 protein	degsl.---ra-----l---l-e-----r	107
SB2 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	108
SB4 protein	degsl.---r-----l---ve-----r	107
B.tabaci HSP70-15	KDLTTNKRALRRRLRTACEKAKRILSSSSQTSIEIDSLFEG	148
B.tabaci HSP70	---k--p-----a-r---t---tea-----a--d-	147
SB1 protein	---rg-n-----a-r---t---tea-----a--vd-	147
SB2 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	148
SB4 protein	---r--p-----a-r---t---tea-----a--md-	147
B.tabaci HSP70-15	IDFYTSITRARFEELNADLFRSTMEPVEKSLRDAKMDKAQ	188
B.tabaci HSP70	v----kvs-----cs-----la---a-t-----ss	187
SB1 protein	--y--kvs-----cs-----lh---a-a---g-gs	187
SB2 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	188
SB4 protein	--y--kvs-----c-----lh---a-n-----gl	187
B.tabaci HSP70-15	THDIVLVGGSTRIPRVQKLLQDFNKGELNKSINPDEAVA	228
B.tabaci HSP70	i--v-----k--s---n--c--s--l-----	227
SB1 protein	i--v-----ki-s---n--c--t--l-----	227
SB2 protein	i-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	228
SB4 protein	i--v-----k--s---n--g--t--l-----a-	227
B.tabaci HSP70-15	YGAAVQAAILHGDKSEEVQDLLLDVTPLSLGIETAGGV	267
B.tabaci HSP70	-----s--t-sqi--v--v--a-----	266
SB1 protein	-----s--t-sai--v--v--a-----	265
SB2 protein	-----l-----nlk-ernvlifdlgg-tfdvsilti	266
SB4 protein	-----s--t-sai--v--v--a-----	265

图 4-8 B 型烟粉虱和其它昆虫 HSP70 部分氨基酸序列的比对。破折号指出与最上一行氨基酸残基相同。黑体字区域表明 HSP70 家族的签名序列。

Fig. 4-8 Alignment of partial amino acid sequences for HSP70 of *B. tabaci* B-biotype and other insects. The dashes indicate identity to the residue in the top line. The sequence signatures for HSP70 family were showed in bold character.

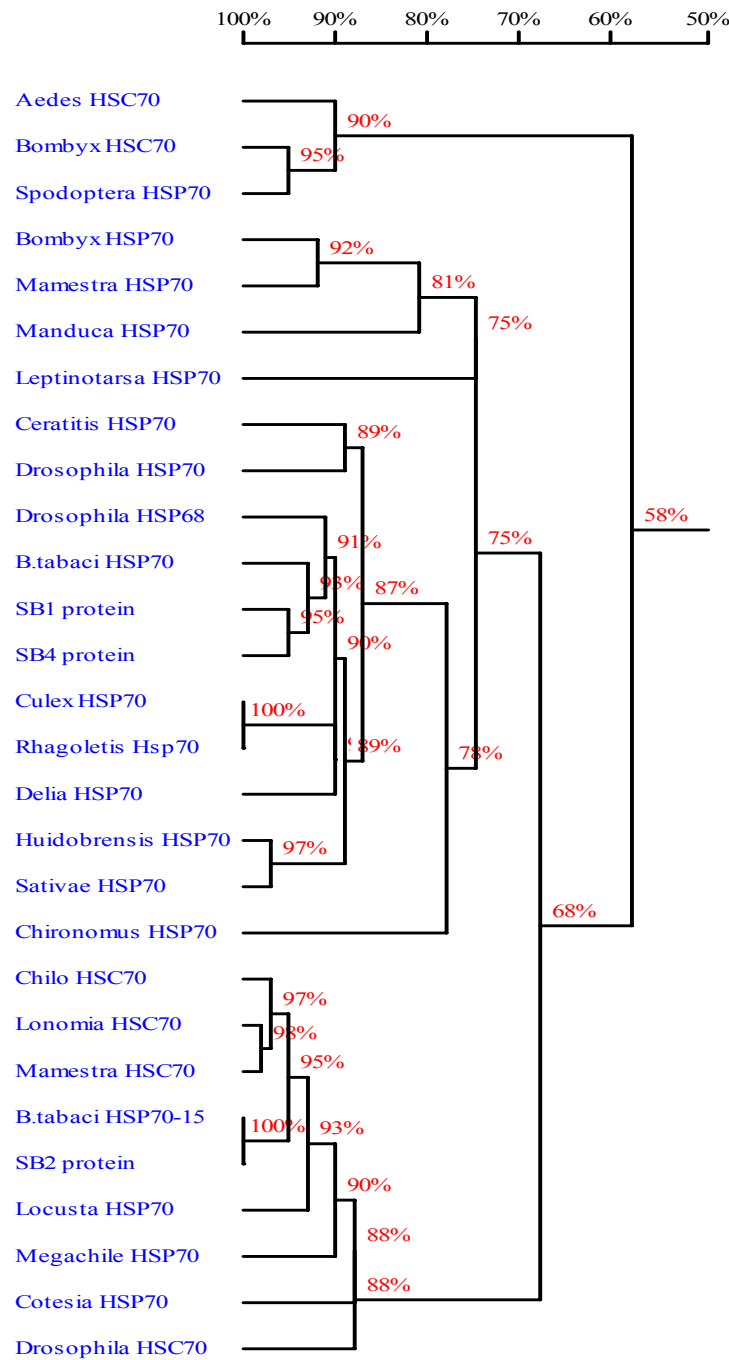


图 4-9 B 型烟粉虱与昆虫组成型 HSC70 和胁迫诱导型 HSP70 蛋白同源性分析

Fig. 4-9 Homology tree of constituted HSC70 and stress-induced HSP70 from insects

Abbreviation: Aedes=*Aedes aegypti*, Bombyx=*Bombyx mori*, Ceratitis=*Ceratitis capitata*, Chilo=*Chilo suppressalis*,
Cotesia=*Cotesia rubecula*, Culex=*Culex pipiens*, Delia=*Delia antique*, Drosophila=*Drosophila melanogaster*,
Leptinotarsa=*Leptinotarsa decemlineata*, Locusta=*Locusta migratoria*, Lonomia=*Lonomia oblique*, Manduca=*Manduca
sexta*, Mamestra=*Mamestra brassicae*, Megachile=*Megachile rotundata*, Rhagoletis=*Rhagoletis pomonella*,
Spodoptera=*Spodoptera frugiperda*, Sativae=*Liriomyza sativae*, Plutella=*Plutella xylostella*, Huidobrensis = *L. Huidorensis*

4.2.6 温室粉虱 hsp70 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

GT1 克隆

Total amino acid number: 130, MW=14501

Max ORF: 2-391, 130 AA, MW=14501

```

1      CCAGGAGTTCAAACGCAAGTACCGCAAAGACATTACAAGCAATTCTCGAGCTCTCAGAAG
1      Q E F K R K Y R K D I T S N S R A L R R

61     ATTGCGAACAGCGGCTGAAAGGGCGAAACGAACACTCTCATCAAGCACCGAAGCCAGCAT
21     L R T A A E R A K R T L S S S T E A S I

121    TGAAATTGACGCCCTTATCGATGGTATCGACTACTACACCAAAGTTTCCAGAGCTCGCTT
41     E I D A L I D G I D Y Y T K V S R A R F

181    TGAAGAACTCTGCTCAGATCTCTTCCGATCAACTCTACATCCAGTTGAGAAAGCCTTGGC
61     E E L C S D L F R S T L H P V E K A L A

241    CGATGCTAACATGGACAAGAGCTCAATTCACGATGTGGTACTAGTCGGCGGATCAACTCG
81     D A N M D K S S I H D V V L V G G S T R

301    CATTCCAAAGGTCCAATCTCTCCTTCAGAACGTCTTCTGCGGAAAATCTCTCAATCTCTC
101    I P K V Q S L L Q N V F C G K S L N L S

361    TATCAATCCAGATGAAGCTGTTGCTTATGGG
121    I N P D E A V A Y G

```

4.2.7 温室粉虱和其它不同物种 hsp70 基因 cDNA 序列同源性比较

将获得的温室粉虱GT1号克隆的序列在GenBank中进行Blastn比对，查询结果为70KDa的hsp。在核苷酸水平上，GT1号克隆核苷酸序列与B型烟粉虱hsp70基因15号和R1号克隆的同源性为75%；与淡色库蚊(*Culex pipiens*)和*Anopheles albimanus*同源性为72% (图4-10)。

利用 DNAMAN 软件对 GT1 推导的氨基酸序列进行比对 (图 4-11)，结果表明与已知的昆虫纲中已知的比较完整的 HSP70 家族氨基酸序列之间相似程度很高。在氨基酸水平，GT1 与和果蝇的同源性非常高，达到 90%；GT1 氨基酸序列与 B 型烟粉虱 HSP70 的同源性分别为 95%。GT1 氨基酸序列中含有 HSP70 家族的 3 个签名序列 (IDLGTTYS (该序列未包括)、IFDLGGGTFDVSIL、VLVGGSTRIP) 中的 1 个。

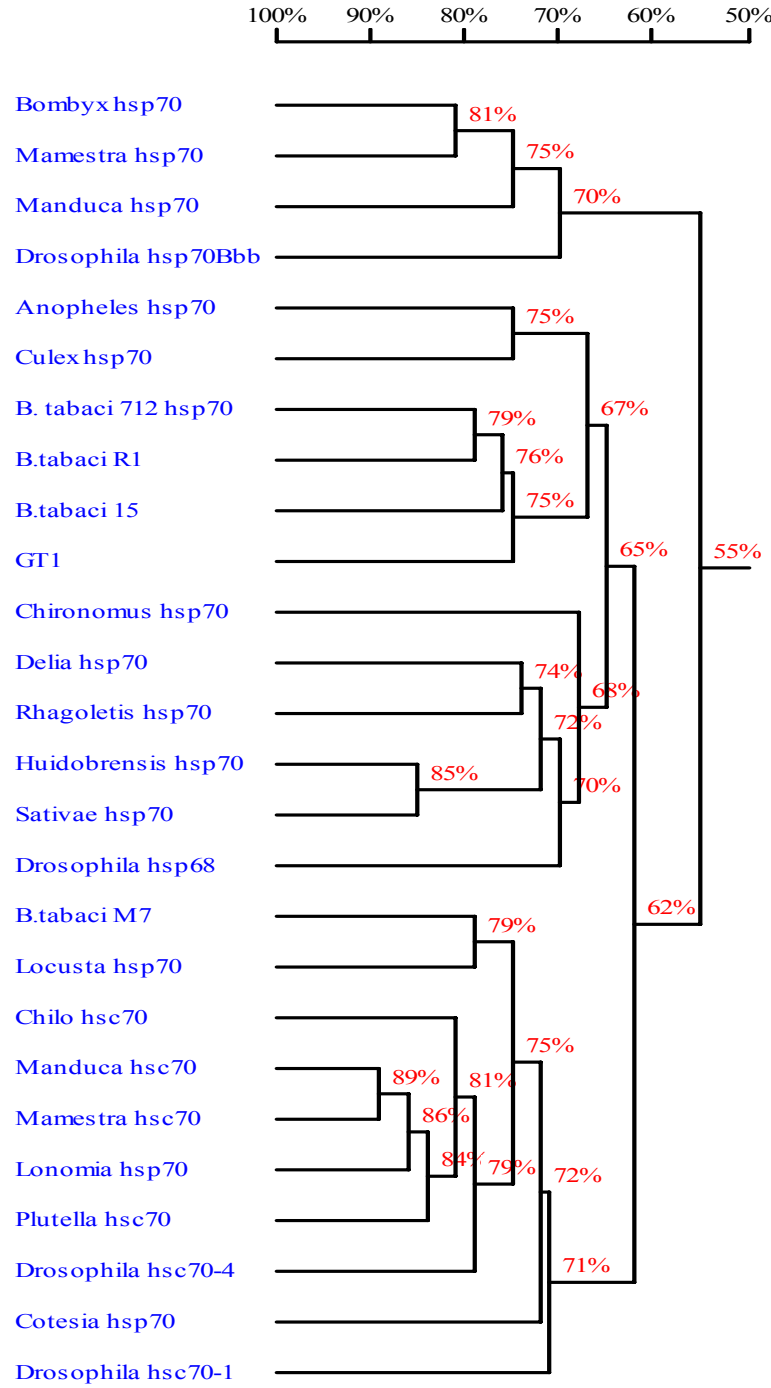


图 4-10 温室粉虱及其它昆虫 hsp70 核苷酸序列同源性比较

Fig. 4-10 Homology analysis on the hsp70 nuclear acid sequences of *T. vaporariorum* and other insects.

Abbreviation: Aedes=*Aedes aegypti*, Bombyx=*Bombyx mori*, Ceratitis=*Ceratitidis capitata*, Chilo=*Chilo suppressalis*, Cotesia=*Cotesia rubecula*, Culex=*Culex pipiens*, Delia=*Delia antique*, Drosophila=*Drosophila melanogaster*, Leptinotarsa=*Leptinotarsa decemlineata*, Locusta=*Locusta migratoria*, Lonomia=*Lonomia oblique*, Manduca=*Manduca sexta*, Mamestra=*Mamestra brassicae*, Megachile=*Megachile rotundata*, Plutella=*Plutella xylostella*, Rhagoletis=*Rhagoletis pomonella*, Spodoptera=*Spodoptera frugiperda*, Sativae=*Liriomyza sativae*, Huidobrensis = *L. huidorensis*

Aedes HSC70	TIDNGVFEVVATNGDTHLGGEDFDQRVMDHFIKLYKKKKG	275
Bombyx HSC70	-----e-----	277
Bombyx HSP70	degsl.---ks-a-----n-lvn-laeef-r-yk	248
Ceratitidis HSP70	degsl.---r--a-----n-lvs-laeef-r-yk	247
Chilo HSC70	--ed-i---ks-a-----n-mvny-vgef-r-yk	250
Chironomus HSP70	degsl.---rs-a-----n-lvn--veef-r-hr	255
Drosophila HSP68	degsl.---rs-a-----n-lvn--aeefqr-yk	242
Cotesia HSP70	s-ed-i---ks-a-----n-mvn--vgef-r-yk	250
Culex HSP70	degsl.---r--a-----n-lvn--aeef-r-yk	248
Delia HSP70	degsl.---r--a-----n-lvt-laeef-r-yk	248
Drosophila HSC70	s--d-i---ks-a-----n-lvt--vgef-r-hk	250
Drosophila HSP70	degsl.---r--a-----n-lvt-ladef-r-fr	170
Huidobrensis HSP70	degsl.---rs-a-----n-lvn-laeef-r-yk	248
Leptinotarsa HSP70	degsl.---r--a-----g---n-lvn-ladef-r-yr	153
Locusta HSP70	--ed-i---k--a-----n-mvn--vgef-r-yk	252
Lonomia HSC70	--ed-i---ks-a-----n--vn--vgef-r-yk	250
Mamestra HSC70	--ed-i---ks-a-----d-mvn--vgef-r-yk	252
Mamestra HSP70	degsl.---r--a-----n-lvn-ladef-r-yk	248
Manduca HSP70	degsl.---k--a-----n-lvn-laeefqr-fk	248
Megachile HSP70	--ed-i---ks-a-----n-mvn--eqef-r-yk	99
Rhagoletis Hsp70	degsl.---r--a-----n-lvn--aeef-r-yk	248
Sativae HSP70	degsl.---rs-a-----n-lvn-ladef-r-yk	248
Spodoptera HSP70	-----e-----	277
B.tabaci HSP70-15	--ed-i---ks-a-----n-mvn--aqef-r-yk	108
B.tabaci HSP70	degsl.---ks-a-----n-lvn-ladef-r-yk	107
GT1 protein	qef-r-yr	8
Aedes HSC70	KDIRKDNRAVQKLRRVEKAKRALSSSHQVRIEIESFYEG	315
Bombyx HSC70	-----k-----f--	317
Bombyx HSP70	--l-lns--lrr--taa-r---t----teat---dal---	288
Ceratitidis HSP70	--l-snp--lrr--taa-r---t----teat---dalf--	287
Chilo HSC70	--ltnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-l---	290
Chironomus HSP70	s-ls-ni--lrr--tac-r---t----teas---dalh--	295
Drosophila HSP68	--l-snp--lrr--taa-r---t----teas--vdalf--	282
Cotesia HSP70	--ltnk--lrr--tac-r---t----s-as---d-lfg-	290
Culex HSP70	--l-tnp--lrr--taa-r---t----teat---dal---	288
Delia HSP70	--l-snp--lrr--saa-r---t----teat---dal---	288

Drosophila HSC70	--ltnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-lf--	290
Drosophila HSP70	--l-snp--lrr--taa-r---t----teat---dal--	210
Huidobrensis HSP70	--l-snp--lrr--taa-r---t----teat--vdal---	288
Leptinotarsa HSP70	--l-snp-slrr--taa-r---t----teat---dal--	193
Locusta HSP70	--ltnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-l---	292
Lonomia HSC70	--ltsnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-lf--	290
Mamestra HSC70	--latnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-lf--	292
Mamestra HSP70	--msnp--lrr--taa-r---t----teat---dal---	288
Manduca HSP70	--l-ssp--lrr--taa-r---t----teat---dal---	288
Megachile HSP70	--lsvnk--lrr--tac-r---t----t-as---d-lf--	139
Rhagoletis Hsp70	--l-tnp--lrr--taa-r---t----teat---dal---	288
Sativae HSP70	--l-snp--lrr--taa-r---t----teat--vdal---	288
Spodoptera HSP70	-----k-----f--	317
B.tabaci HSP70-15	--ltnk--lrr--tac-----i----s-ts---d-lf--	148
B.tabaci HSP70	--lktnp--lrr--taa-r---t----teas---dal--	147
GT1 protein	---tsns--lrr--taa-r---t----teas---dalid-	48
Aedes HSC70	DDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLEDADMNKKD	355
Bombyx HSC70	--s-----l-----	357
Bombyx HSP70	i--ytrvs--r-----a----g-le--e-a-k--kld-sq	328
Ceratitis HSP70	i--lytkvs--r-----ca----q-le--e-a-n--k-d-nq	327
Chilo HSC70	i--ytsi---r-----a-----e--e-s-r--k-d-dq	330
Chironomus HSP70	i--yski---r---m-----le--era-r--k-d-nq	335
Drosophila HSP68	h--ytkis--r-----cg----n-lq--e-a-n--k-d-gq	322
Cotesia HSP70	i--ytsi---r-----ca----n-le--e-s-r--kid-sa	330
Culex HSP70	v--ytkis--r---mcg-----ld--e-a-n--k-d-sq	328
Delia HSP70	v--ytkvs--r-----ca----n-lq--e-a-n--k-d-nq	328
Drosophila HSC70	t--ytsi---r-----a-----d--e-a-r--kld-sv	330
Drosophila HSP70	h--ytkvs--r-----ca----n-lq--e-a-t--k-d-gq	250
Huidobrensis HSP70	v--ytkvs--r-----ca-----le--e-a-n--k-d-nq	328
Leptinotarsa HSP70	i--ytkis--r-----cs----g-lq--e-a-n--k-d-gq	233
Locusta HSP70	i--ytsi---r-----a-----e--e-a-r--k-d-aq	332
Lonomia HSC70	i--ytsi---r-----a-----e--e-s-r--k-d-sq	330
Mamestra HSC70	i--ytsi---r-----a-----e--e-spr--k-d-sq	332
Mamestra HSP70	i--ytrvs--r-----ca----g-ld--e-a-k--k-d-sq	328
Manduca HSP70	i--ytrvs--r-----a----g-ld--e-a-k--k-d-sq	328
Megachile HSP70	i--ytsi---r-----cs-----le--e-a-r--k-d-sq	179
Rhagoletis Hsp70	v--ytkis--r---mcg-----ld--e-a-n--k-d-sq	328

Sativae HSP70	v--ytkvs--r----ca-----le--e-a-n--k-d-nq	328
Spodoptera HSP70	e-----l-----	357
B.tabaci HSP70-15	i--ytsi---r-----a-----e--e-s-r--k-d-aq	188
B.tabaci HSP70	v--ytkvs--r----cs-----la--e-a-t--k-d-ss	187
GT1 protein	i-yytkvs--r----cs-----lh--e-a-a--n-d-ss	88
Aedes HSC70	VDEIV LVGGSTRIP KVQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVA	395
Bombyx HSC70	-----	397
Bombyx HSP70	ihdv-----tmlqn--c--klnls-----	368
Ceratitidis HSP70	ihvy-----r-lqs--c--slnls-----	367
Chilo HSC70	ihd-----k-lqd-----lnks-----	370
Chironomus HSP70	ihdv-----i-kmlqd--c--slnls-----	375
Drosophila HSP68	ihd-----s-lqn--g--slnls-----	362
Cotesia HSP70	ih-----i-k-lqdl-----lnks-----	370
Culex HSP70	ihd-----s-lqs--g--slnls-----	368
Delia HSP70	ihd-----n-lqq--c--slnls-----	368
Drosophila HSC70	ihd-----r-lqdl-----lnks-----	370
Drosophila HSP70	ihd-----a-lq-y-h--slnls-----	290
Huidobrensis HSP70	ihd-----n-lqs--c--slnls-----	368
Leptinotarsa HSP70	ihdv-----i---lqny---slnls-----	273
Locusta HSP70	ihd-----k-lqd-----lnks-----	372
Lonomia HSC70	ihd-----k-lqd-----lnks-----	370
Mamestra HSC70	ihd-----k-lqd-----lnks-----	372
Mamestra HSP70	ihdv-----s-lqn--c--klnls-----	368
Manduca HSP70	ihdv-----s-lqn--c--klnls---gprrs	368
Megachile HSP70	-hs-----i-k-lqd-----lnks-----	219
Rhagoletis Hsp70	ihd-----s-lqs--g--slnls-----	368
Sativae HSP70	ihd-----n-lqs--c--slnls-----	368
Spodoptera HSP70	-----	397
B.tabaci HSP70-15	thd-----r--k-lqd-----lnks-----	228
B.tabaci HSP70	ihdv-----s-lqn--c--slnls-----	227
GT1 protein	ihdv-----s-lqnv-c--slnls-----	128

图 4-11 温室粉虱 HSP70 氨基酸序列和其它昆虫 HSP70 部分氨基酸序列比对。破折号指出与最上一行氨基酸残基相同。黑体字区域表明 HSP70 家族的签名序列。

Fig. 4-11 Alignment of partial amino acid sequences for HSP70 of *T. vaporariorum* and other insects. The dashes indicate identity to the residue in the top line. The sequence signatures for HSP70 family were showed in bold character.

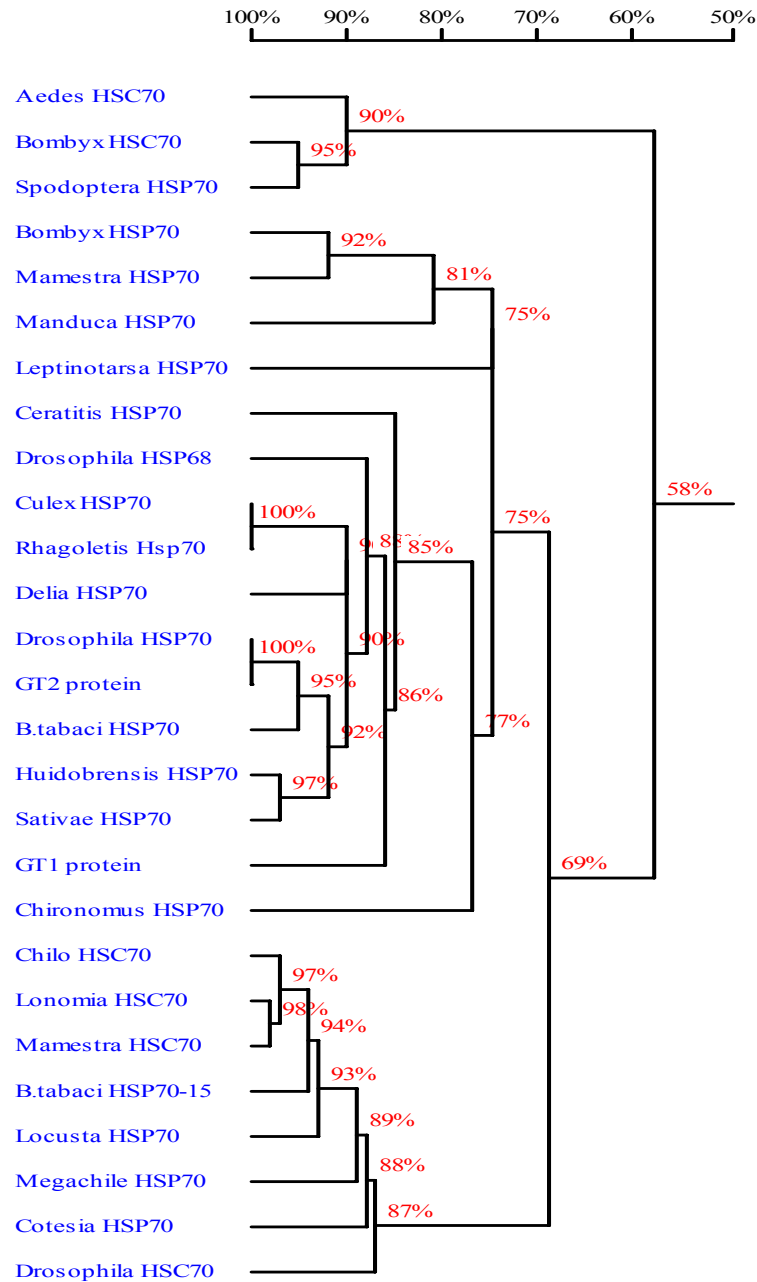


图 4-12 温室粉虱与昆虫组成型 HSC70 和胁迫诱导型 HSP70 蛋白同源性分析

Fig. 4-12 Homology tree of constituted HSC70 and stress-induced HSP70 from insects

4. 3 小结与讨论

成功克隆了 B 型烟粉虱热激蛋白 hsp70 基因 3 条 cDNA 片段。3 条片段均具有部分 HSP70 蛋白家族签名序列(Gupta,1995)，说明这三条序列都是编码 HSP70 蛋白的 cDNA 序列。对它们以及其它昆虫 hsp70 基因核苷酸和氨基酸序列进行同源性比较，发现 hsp70 基因家族具有较高的保

守性。在核苷酸水平上, SB1、SB2 和 SB4 均存在较大的差异。在氨基酸水平, SB1 和 SB4 同源性较高, 达到 94%, 而 SB2 和 SB1、SB4 的同源性较低, 分别为 78.3%和 79.4%。

HSP70 蛋白家族分为 HSP70(诱导型)和 HSC70(组成型)两种类型的蛋白, 前者在正常生理条件下表达量很小, 或不表达, 受到胁迫时才呈十倍或百倍的增加, 这两种类型的蛋白之间同源性非常高, 但是同一类型在不同物种中的相似程度超出了不同类型在同一物种内的相似程度(Charlotte et al., 1997), 这也说明两者功能的特化。本研究获得了 B 型烟粉虱 hsp70 基因 3 条 cDNA 片段, 通过比对, SB1 和 SB4 很可能编码诱导型 HSP70, SB2 可能编码组成型 HSC70。在果蝇等多种昆虫中, 诱导型 hsp70 在抵抗各种胁迫方面作用突出; 而组成型 HSC70 在能量代谢等方面具有重要作用(Shim et al., 2006)。B 型烟粉虱 HSP70 蛋白家族的组成以及各种 HSP70 的作用目前还不清楚, 编码 HSP70 的不同 cDNA 序列的发现, 为进一步深入全面研究烟粉虱 HSP70 蛋白家族的功能奠定了基础。

B 型烟粉虱是一种耐热性昆虫, 在其种群在自然界中常遭受高温刺激, 为了了解 HSP70 在 B 型烟粉虱抵抗高温中的作用, 有必要对高温胁迫后 B 型烟粉虱 hsp70 的表达进行研究。因此, 我们将获得的 B 型烟粉虱 hsp70 基因 3 条 cDNA 片段与已知昆虫 hsp70 序列进行比较, 找出 B 型烟粉虱编码诱导型 hsp70 的序列, 并利用实时荧光定量检测体系来研究 B 型烟粉虱 hsp70 基因表达规律(见第五章)。

第五章 B 型烟粉虱热激蛋白基因 hsp70 表达与耐热性调控

生物体在遭受胁迫时，体内HSPs表达量的上升对抵抗胁迫刺激具有重要意义（Feder and Hofmann, 1999）。而生物体内HSPs含量发生急剧变化的原因很可能是应激时hsp基因转录水平发生了变化。例如，生物体在高温刺激下hsp70基因被激活，其RNA聚合酶在转录调控因子调节下，迅速激活hsp70基因的启动子，大量转录hsp70mRNA而合成HSPs，导致HSP70 的表达水平升高（李俊杰等，2004）。因此，hsp70基因表达的丰度代表了生物对不同胁迫的反应强度。

本章通过研究温度变化对 B 型烟粉虱 hsp70 基因表达的影响，探索 HSP70 在 B 型烟粉虱抵抗高温胁迫中的作用。

5.1 材料与方法

5.1.1 实验材料

（1）供试虫源

实验中所用的 B 型烟粉虱成虫采自中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所温室长期保持的实验种群或中国农业科学院品质所温室种群。农业环境与可持续发展研究所温室内的平均温度 22-28℃，相对湿度为 50–60%，自然光。品质所温室的温度、相对湿度和光线均为自然条件。实验中 B 型烟粉虱的寄主植物为棉花（*Gossypium hirsutum* L.，泗棉 3 号）。

（2）主要试剂

Trizol 试剂，SuperScript™First-Strand Synthesis System 试剂盒购自 Invitrogen 公司；Taq 酶、dNTP 购自 NEB 公司；pMD18-T vector 连接试剂盒购自 Takara 公司；琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自天根公司；ABI TaqMan 2×PCR Master mix 以及荧光 PCR 八连管及管盖为美国 ABI 公司产品。

5.1.2 总 RNA 提取与检测

（1）总 RNA 提取：采集 B 型烟粉虱成虫于 39℃下热激处理 1 小时在 26℃放置 1h 后提取 B 型烟粉虱总 RNA（具体操作见第四章）。

（2）总 RNA 质量与浓度检测：分别取 2μl RNA 样品用于 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测。RNA 样品 A260/A280 的比值应该在 1.8-2.0 之间；28S 和 18S 条带要求明亮、清晰、条带锐利（指条带的边缘清晰），并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上。

5.1.3.反转录合成第一链 cDNA

取 2μg RNA用Invitrogen公司生产的SuperScript™First-Strand Synthesis System试剂盒合成 cDNA第一链。

5.1.4 引物、探针设计与合成

根据 B 型烟粉虱 hsp70 基因序列（登录号：EF488763）设计 B 型烟粉虱 hsp70 基因的 Taqman-MGB 探针及引物，扩增片段长度为 62bp。由于与探针的配套引物所扩增的目的片段较短，在做克隆时成功率低，因此设计了一对外围引物用于制作标准品，扩增片段长度为 323 bp。以上探针和引物均由上海基康生物技术有限公司设计合成。

ACAGTGCCCGCGTATTTCAACGACTCTCAGCGACAAGCTACCAAAGATGCAGGAGCTATCA
CAGGACTCAACGTTCTCCGCATCATCAATGAGCCCACAGCTGCAGCCCTTGCGTATGGCTT
GGACAAAAACCTCAAAGGGGAACGCAACGTTCTCATTTTCGATCTCGGTGGTGGCACATTC
GACGTCTCCATCCTTACAATTGACGAGGGCTCACTGTTTGAAGTGCGATCGACTGCTGGCG
ACACACACCTCGGCGGTGAGGACTTCGATAACCGGCTTGTCAACCACTTTGTGGAGGAATT
CAAGCGTAAATATCGAAAAGATCTCCGAACCAACCCCGTGCTCTCAGAAGACTTCGCACA
GCAGCAGAGCGGGCCAAAAGAACATTGTCCTCAAGTACCGAAGCCAGCATTGAAATTGAC
GCTCTGATGGATGGCA**TCGACTACTACACCAAGGTCTCAAGA**GC GCGATTGGAAGAACTTT
GTGCAGACTTATTCGCTCGACTCTACATCCTGTGCGAGAAAGCTCTCAACGATGCCAAAAT
GGACAAAGGCTTAATCCATGATGTTGTGTTGGTTGGAGGCTCCACGCGAATTCCCAAAGTT
CAATCTCTTCTCCAGAACTTCTTCGGTGGA AAAACTCTGAATCTTTCCATCAACCTGATGA
AGCCGCGGCTTACGGAGCAGCAGTTCAAGCAG**CGATTCTCAGCGGTGATACCA**G**CTCAGC**
TATCCAAGATGTTCT**TCCTTGTCGACGTAGCACCC**CTCTCACTTGGAATTGAAACAGCAGGC
GGCGT

SB4 基因引物及探针序列：

SB4-FP: 5' -CGATTCTCAGCGGTGATACCA- 3'

SB4-RP: 5' -GGGTGCTACGTCGACAAGGA- 3'

SB4-Probe: 5' -FAM-CTCAGCTATCCAAGATG-MGB- 3'

SB4 基因用于制备标准品的外围引物序列：

SB4-FP1: 5' -TCGACTACTACACCAAGGTCTCAAGA- 3'

SB4-RP2: 5' -GGGTGCTACGTCGACAAGGA- 3'

5.1.5 标准曲线样品的制备与实时荧光定量检测

5.1.5.1 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段 RT-PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 第一链为模板，用目的基因的外围引物（SB4-FP 和 SB4-RP）扩增 B 型烟粉虱 hsp70 基因 cDNA 片段，扩增片段的长度为 323bp。PCR 反应体系为 10×PCR buffer 5.0μl，10mmol/L dNTPs 1.5μl，正反向引物（10μM）各 1.5μl，Taq 酶 0.25μl，cDNA 2μl，加水至 50μl，轻轻混匀后离心收集，然后放入 PTC-200PCR 仪（MJ rearsh 公司）中扩增。PCR 仪中运行程序：94℃预变性 5min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，循环 40 次；72℃延伸 10 min。扩增完毕后，取 8μl PCR 产物，用 1.5%琼脂糖凝胶电泳，0.5×TBE 缓冲液进行电泳检测，电泳结果凝胶成像系统观察分析。

5.1.5.2 PCR 扩增产物克隆与测序

按照琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒的使用说明将 PCR 产物回收纯化后克隆到 p MD18-T Vector 载体，然后转化到 JM109 感受态细胞。转化结束后挑取白色菌落，培养后用目的基因的外

引物进行 PCR 扩增，以确定产物的片段长度与插入的片段是否一致。确认后挑取与插入片段一致的菌株进行培养将培养后的菌液用于测序或用试剂盒提取后制备标准品。

5.1.5.3 质粒浓度测定及拷贝数换算

以紫外分光光度计检测质粒DNA浓度，计算质粒浓度与质粒拷贝数（公式如下）：

质粒浓度(ng/μl)=OD₂₆₀×50μg/ml×稀释终体积(ml)×1000/稀释时加入的原始溶液体积(ul)

质粒拷贝数(Copies/μl)=质粒浓度(ng/μl)×6.02×10¹⁴/660×碱基数(载体的+插入片段的)

5.1.5.4 标准曲线样品的制备与实时荧光定量 PCR 检测

将质粒稀释为 2.0×10⁷ 拷贝数后进行倍比稀释，即取 10μl 质粒加入 90μl 双蒸水，混匀，依次类推，直到 2.0×10² 拷贝数，共 6 个梯度。将上述 6 个浓度梯度的质粒进行实时荧光PCR扩增，然后根据拷贝数和Ct值（每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的PCR循环数）制作标准曲线。这几个浓度的样品保存于-70℃作为以后的标准样品。

定量PCR检测的反应体系（25μl）为TaqMan PCR Master mix 12.5μl，Probe（20μM）0.625μl，正反向引物（20μM）各 1.125μl，cDNA 2μl，H₂O 7.625μl。完成上述步骤后，把加好样品的 96 孔板放在荧光定量PCR仪（美国ABI 7700 型）上进行反应，PCR循环条件：50℃ 2min；95℃ 10min；然后 95℃ 15s，60℃ 30s，40 cycles。

5.1.6 B 型烟粉虱 hsp70 表达的定量检测

5.1.6.1 高温胁迫下 B 型烟粉虱 hsp70 表达的定量检测

在农业环境与可持续发展研究所温室气温为 26℃时采集 B 型烟粉虱成虫到 Eppendorf 管中，每个管内大约有 200 头粉虱。将粉虱分别在 37℃、39℃、41℃、43℃和 45℃下热激处理 1 小时后在 26℃恢复 1 小时。然后用液氮迅速冷冻后提取总 RNA 提取，进行质量和浓度检测后取 2μg 合格的总 RNA 反转录合成第一链 cDNA。用管家基因（β-actin）对反转录样品进行 PCR 扩增来检测反转录是否成功，然后对样品进行实时荧光定量检测。每个样品重复 3 次。

5.1.6.2 气温变化对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响

分别于 10:00，12:00，14:00，19:00 在品质所温室中采集 B 型烟粉虱成虫提取总 RNA 并进行质量与浓度检测，然后取 2μg 合格的总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。用管家基因（β-actin）对反转录样品进行 PCR 扩增来检测反转录是否成功，将反转录成功的样品进行荧光定量检测。每个样品 3 次重复。

5.2 数据分析

标准样品的荧光定量PCR扩增曲线由PCR仪自动生成。标准样品质粒拷贝数和Ct值之间的线性关系分析以及不同时间采集的B型烟粉虱成虫样品中的质粒拷贝数之间的显著性差异分析用统计软件SPSS 进行（SPSS10.0，SPSS Inc., USA），显著性检验水平均为P≤0.05。

5.3 结果与分析

5.3.1 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA 片段 RT-PCR 扩增

以总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链后用目的基因的外围引物（SB4-FP 和 SB4-RP）进行扩增，结果表明有 300bp 左右条带出现，与实验设计相符，结果见图 5-1。

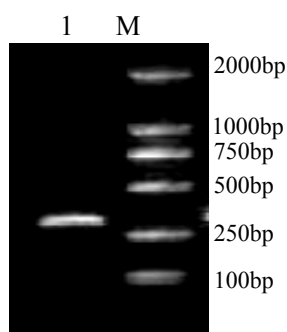


图 5-1 B 型烟粉虱 hsp70 cDNA RT-PCR 扩增结果

Fig. 5-1 The result of RT-PCR amplification for *B. tabaci* B-biotype hsp70 partial cds

1: RT-PCR 扩增产物 RT-PCR product; M: 标准分子量 DNA marker

5.3.2 重组质粒的鉴定和测序

将重组质粒直接进行 PCR 扩增，发现存在目的条带（图 5-2）；进行测序后将结果与 GeneBank 提供的序列进行比对，同源性达到 100%，说明在构建的重组质粒中含有目的基因。

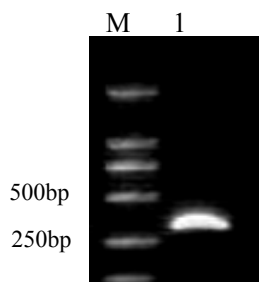


图 5-2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 5-2 PCR analysis of the recombined plasmid

1: 重组质粒 Recombinant plasmid DNA; M: 标准分子量 DNA marker

5.3.3 标准曲线样品的制备与实时荧光定量检测

由图5-3可见，模板浓度越高，可检测到荧光信号的循环数越少，即其Ct值越小；随着循环数的增加，荧光信号逐渐增强，而当循环数达到一定程度时，荧光强度达到平台；经梯度稀释的模板浓度每降低10倍，可检测到荧光信号的起始循环数增加约3-4次（图5-3）。标准品的模板浓度与可检测到荧光信号的循环数呈显著的线性关系，其相关系数 r^2 为0.9991（图5-4），表明这个标准曲线可以在较宽的范围内用于B型烟粉虱hsp70表达的绝对定量检测。

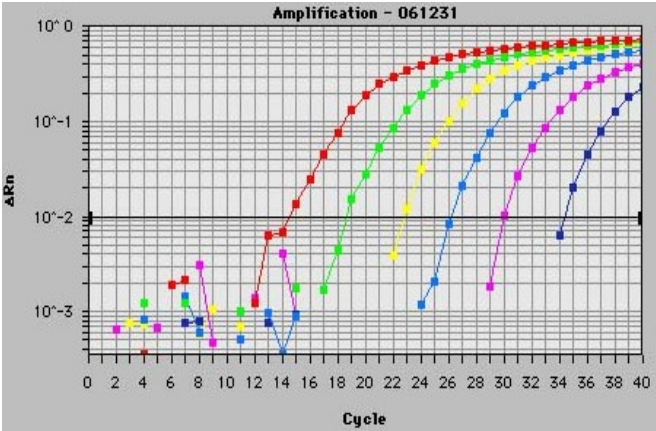


图 5-3 标准品的荧光定量PCR扩增曲线（基线上方从左到右标准品的浓度分别为 2.00×10^7 、 2.00×10^6 、 2.00×10^5 、 2.00×10^4 、 2.00×10^3 、 2.00×10^2 ）

Fig. 5-3 Amplication curve of standard samples using Real-time PCR. (Copies of standard samples from left to right: 2.00×10^7 、 2.00×10^6 、 2.00×10^5 、 2.00×10^4 、 2.00×10^3 、 2.00×10^2 , respectively

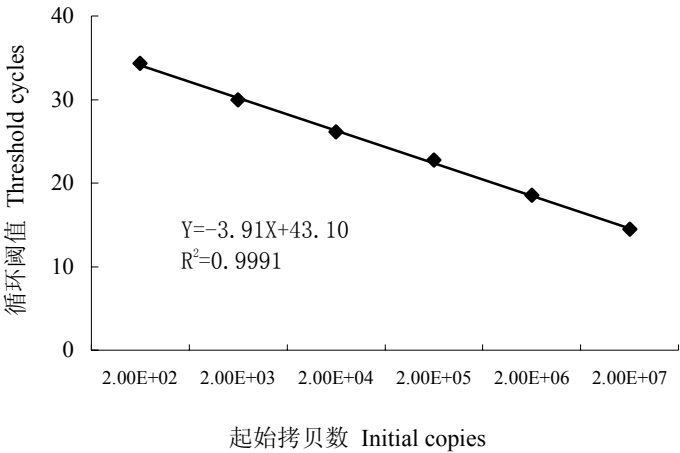


图 5-4 已知标准品拷贝数时所绘制的标准曲线

Fig. 5-4 Linear standard curve with known copies of hsp70 partial cds of *B. tabaci* B-biotype

5.3.4 高温胁迫对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响

B型烟粉虱成虫在 37℃下胁迫 1 小时后就可以检测到粉虱体内有hsp70 表达（表 5-1）；随着胁迫温度的升高，B型烟粉虱的hsp70 的表达量也逐渐升高，在 41℃时达到了最高峰（ $1.99\times10^7\pm1.45\times10^5$ copies），此后随后随着温度的升高，hsp70 表达量迅速下降，经过 43℃的高温处理 1 小时后，hsp70 表达量从表达量下降到 $3.60\times10^4\pm2.00\times10^3$ copies；在 45℃下处理 1 小时后，hsp70 基因表达量仅有 $1.76\times10^4\pm1.53\times10^3$ copies。

表 5-1 高温暴露后 B 型烟粉虱 hsp70 基因表达的实时荧光定量 PCR 检测

Table 5-1 Detection of hsp70 gene expression in *B. tabaci* B-biotype adults after exposure to high temperature for 1h using real-time fluorescence quantitative real time PCR

温度 (°C)	循环阈值 (Ct)	起始拷贝数 (copies/μl)
Temperature	Threshold cycles	Initial copies
37	23.12	$8.78 \times 10^5 \pm 6.41 \times 10^4$ a
39	21.48	$2.46 \times 10^6 \pm 1.38 \times 10^5$ b
41	18.08	$1.99 \times 10^7 \pm 1.45 \times 10^5$ c
43	28.27	$3.60 \times 10^4 \pm 2.00 \times 10^3$ d
45	29.48	$1.76 \times 10^4 \pm 1.53 \times 10^3$ d

表中起始拷贝数数据为平均值±标准误, 同列数据后标有不同字母表示差异显著($P \leq 0.05$, S-N-K检验)。

The data about initial copies in the table are mean ±SE and the means within the same column followed by different letters are statistically significant by S-N-K test ($P \leq 0.05$)

5.3.5 气温变化对 B 型烟粉虱成虫 hsp70 表达的影响

B型烟粉虱体内的hsp70 表达随着气温的变化而变化(表 5-2)。当上午 10:00 点气温达到 34℃ 时即可检测到粉虱体内有hsp70 的表达 ($1.16 \times 10^5 \pm 1.48 \times 10^4$ copies)；随着气温的升高，B型烟粉虱成虫体内hsp70 表达显著增加，当上午 12:00 点与下午 14:00 点气温上升到 41℃和 41.5℃时粉虱体内hsp70 的表达量分别上升到 $6.29 \times 10^6 \pm 1.80 \times 10^5$ copies和 $6.47 \times 10^6 \pm 1.91 \times 10^5$ copies；到傍晚 19:00 点气温下降到 33℃时粉虱体内hsp70 表达量也下降到 $2.32 \times 10^5 \pm 7.69 \times 10^3$ copies。

表 5-2 气温变化对 B 型烟粉虱 hsp70 表达的影响

Table 5-2 Effect of temperature change in greenhouse on expression of hsp70 gene in *B. tabaci* B-biotype adults

时间 (h)	温度 (°C)	循环阈值 (Ct)	起始拷贝数 (copies/μl)
Time of day	Temperature	Threshold cycles	Initial copies
10:00	34.0	25.52	$1.16 \times 10^5 \pm 1.48 \times 10^4$ a
12:00	41.0	19.94	$6.29 \times 10^6 \pm 1.80 \times 10^5$ b
14:00	41.5	18.00	$6.47 \times 10^6 \pm 1.91 \times 10^5$ b
19:00	33.0	24.20	$2.32 \times 10^5 \pm 7.69 \times 10^3$ a

表中起始拷贝数数据为平均值±标准误, 同列数据后标有不同字母表示差异显著($P \leq 0.05$, S-N-K检验)。

The data about initial copies in the table are mean ±SD and the means within the same column followed by different letters are statistically significant by S-N-K test ($P \leq 0.05$)

5.4 小结与讨论

实时荧光定量PCR技术 (real-time fluorescence quantitative PCR) 是在常规PCR技术上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术。与传统的PCR技术相比, 实时荧光定量PCR由于具有实时检测、高度灵敏, 无需电泳、快速、可定量等优点而大受欢迎和广泛应用 (Ginzinger 2002)。目前一般是在实时荧光定量PCR反应体系中加入探针如分子信标、TaqMan探针或加入荧光染料 (SYBR Green I) 嵌入双链进行实时检测。其中TaqMan探针由于具有较高序列特异性, 所得数据更为精确, 并适合检测低拷贝模板而备受青睐 (Whelan et al., 2003; 袁媛等, 2006)。在本研究中使用的是新一代的TaqMan-MGB 探针, 其 3'端标记的荧光淬灭基团是一种基本无荧光本底的小沟结合物, 取代了常规可发光的TAMRA 荧光标记, 使得荧光本底大大降低, 提高了分辨率; 探针 3'端结合了MGB (minor groove binder) 结合物, 使得探针的 T_m 值有近 10°C 的提高, 也就提高了配对序列与非配对序列的差异, 从而使探针的杂交稳定性和特异性显著增强; 探针长度缩短 (一般在 13-18 个碱基内), 淬灭基团与报告基团在空间位置上更加接近, 实验结果也更精确; 一些无法设计常规TaqMan 探针的目的基因片段也可以很容易地设计出TaqMan MGB 探针, 从而可提高了方法的可行性 (Saavedra et al., 1996)。热激蛋白可以分为组成型热激蛋白 (heat cognate proteins, HSC) 和诱导型热激蛋白 (heat inducible proteins, hsp)。前者在正常生理条件下就存在, 后者正常生理条件下表达量很小, 或不表达, 在受到胁迫 (如高温) 时含量迅速增加, 两者之间同源性非常高 (Petr et al., 2001)。根据王海鸿 (2005) 的研究, B型烟粉虱体内存在组成型热激蛋白和诱导型热激蛋白, 并由不同cDNA序列编码HSP70 (或HSC70), 这些基因在编码区有很高的同源性。通过设计TaqMan-MGB 探针进行实时荧光定量RT-PCR可以达到有针对性的研究B型烟粉虱某种热激蛋白并进行准确定量的目的。我们在构建B型烟粉虱hsp70 基因表达定量检测平台过程中, 利用RT-PCR及T载体技术获得了含探针序列的hsp70 cDNA片段克隆; 以经过倍比稀释的重组质粒为模板, 利用TaqMan-MGB 探针及其相应的特异性引物进行实时荧光定量PCR扩增并绘制标准曲线。分析该曲线, 显示各梯度之间间隔的Ct值大致相等, 各梯度均能在一条直线上, 相关系数 R^2 大于 0.99, 所得的曲线较理想, 说明成功构建了B型烟粉虱热激蛋白hsp70 基因表达的实时荧光定量RT-PCR参考标准。这为深入研究温度对B型烟粉虱热激蛋白hsp70 基因表达的影响以及B型烟粉虱耐热机制奠定了基础。

大量研究证明, HSPs 的合成与生物体耐热性的获得成正相关, 在较低温度下热激处理诱导生物体内 HSPs 合成, 使得生物体在更高温度下的存活率上升。例如, 非洲蝗虫在 50°C 热激处理 2 小时后全部死亡, 但在 $39-45^{\circ}\text{C}$ 之间预处理一下, 可以增加其在更高温度下的存活 (Whyard et al., 1986)。太阳照射下的果蝇幼虫和蛹体内大量表达 HSP70 后可以抵抗 40°C 高温 (Feder and Krebs, 1997)。通过对热休克基因缺失突变体的研究证明, 至少某些 HSPs 对有机体在高温下的存活和耐热性的获得是必需的 (Parsell and Lindquist, 1994)。例如, 把多拷贝的 hsp70 基因或 hsp70 反义基因转移到果蝇培养细胞或活体内的分子试验证明, HSP70 在果蝇耐热性的获得上具有重要作用 (Solomon et al., 1991; Feder et al., 1996)。生物体在遭受高温胁迫时体内 HSPs 含量发生急剧变化的原因可能是应激时 hsp 基因转录水平的变化, 例如生物体在高温刺激下 hsp70 基因被激活, 其 RNA 聚合酶在转录调控因子调节下, 迅速激活 hsp70 基因的启动子, 大量转录 hsp70 mRNA 而合成 HSPs, 导致 HSP70 的表达水平升高 (李俊杰等, 2004)。由于昆虫在高温或低温胁迫下诱

导产生热激蛋白, 但转录的最高水平和最大表达量并不是在胁迫过程中和胁迫刚结束时即产生, 一般需要适当时间的恢复才达到最大表达量 (Goto and Kimura, 1998; Rinehart et al, 2000)。因此, 本研究中让处理后的 B 型烟粉虱成虫在 26℃ 下恢复 1h, 从而有利于 hsp70 mRNA 转录完成和 HSP70 的积累。结果发现, 在 37℃-41℃ 范围内将 B 型烟粉虱成虫热激处理 1 小时后其体内 hsp70 基因表达水平随着温度的升高而上升, 在 41℃ 时 hsp70 基因表达量最大; 当热激温度上升到 43℃ 和 45℃ 时, 粉虱体内的 hsp70 基因表达水平又迅速下降。这很可能是由于在 37℃-41℃ 范围内 B 型烟粉虱受到突然的温度变化, 发生了热激反应, 体内 hsp70mRNA 被迅速合成; 但 HSP70 对细胞的保护只能在一定范围内起作用, 应激超过一定的强度时, HSPs 的保护作用也是无能为力, 所以在 43℃ 和 45℃ 时, 粉虱体内的 hsp70 基因转录过程受到抑制, hsp70 基因表达水平又迅速下降 (李俊杰等, 2004)。同时我们也观察到, 在温室条件下粉虱体内 hsp70 基因的表达水平随着气温的变化而变化: 在气温较高的中午 12 点与下午 2 点时 B 型烟粉虱成虫体内 hsp70 基因的表达量分别比上午 10 点时的表达量上升了 52.5 和 54.2 倍; 而在傍晚当温度下降, 诱导压力降低时, hsp70 基因的表达量也随之下降。昆虫是变温动物, 对温度变化非常敏感。而在自然界中, 环境处于不断变化当中, 昆虫难以避免要受到温度变化的胁迫。当 B 型烟粉虱受到温度胁迫, 尤其是极端温度胁迫时, hsp70 基因迅速表达, 合成 HSP70, 可以提高 B 型烟粉虱在高温下耐热性, 这对种群的存在与发展具有重要意义。但从 mRNA 到产生有功能活性的 HSPs 蛋白之前, 还要经过转录本的剪接和蛋白的翻译后修饰等步骤, 所以说 mRNA 的表达情况并不完全等同于蛋白的表达情况 (Salvucci et al., 2000)。因此在以后的实验中还应当结合蛋白方面检测来研究 HSPs 在 B 型烟粉虱抵抗高温方面的作用。

生物体通过提高 HSPs 表达量获得耐胁迫能力的同时, 往往需要付出一定的代价 (Hoffmann, 1995; Feder and Hoffmann, 1999), 如生殖力降低、生长缓慢、能量消耗增加、寿命缩短等。在我们之前的研究中发现, B 型烟粉虱成虫在 41℃ 下热激 1h 后, 其存活率和产卵量与对照 (26℃) 相比没有显著差异, 但是其后代卵的孵化率仅有 52.3%。Silbermann 和 Tatar (2000) 的研究也表明, 果蝇在受到短暂热激后体内表达的 HSP70 会导致其后代卵的孵化率降低。B 型烟粉虱和温室粉虱在遭受高温胁迫后其后代卵的孵化率或生存能力的降低是否是 HSP70 表达有关还有待深入研究。

B 型烟粉虱与温室粉虱是近缘种, 前者的耐热性要显著高于后者。据报道, 耐热能力的种间差异可能与热激蛋白 HSP70 的诱导有关 (Goto and Kimura, 1998; Krebs and Bettencourt, 1999)。通过比较研究两种粉虱热激蛋白 HSP70 的表达差异对揭示其高温耐受性的分子机制有重要意义, 这也是后继工作的一个研究方面。

第六章 结论与展望

6.1 结论

6.1.1 B 型烟粉虱和温室粉虱耐热性研究

在 37℃ 和 39℃ 下, B 型烟粉虱成虫的存活率要显著高于卵和成虫。但当温度上升到 43℃ 和 45℃ 时, B 型烟粉虱伪蛹的耐热性要高于卵和成虫。在温室粉虱 3 个虫态(卵、伪蛹和成虫)中, 卵的耐热性要高于其它 2 个虫态。

将两种粉虱耐热性进行比较, 随着温度的升高和暴露时间的延长, 两种粉虱存活率均下降, 但在相同的处理条件下, 温室粉虱 3 个虫态存活率均要低于 B 型烟粉虱。温室粉虱对高温敏感, B 型烟粉虱耐热性高于温室粉虱。

6.1.2 B 型烟粉虱和温室粉虱不同性别成虫耐热性研究

B 型烟粉虱和温室粉虱均是雌虫的耐热性高于雄虫。对 B 型烟粉虱和温室粉虱成虫的存活率和暴露温度间进行回归分析发现对于不同性别成虫二者关系均符合非线性模型 $y = 1/(a+be^x)$ (r^2 范围 0.9659 to 0.9970, $P < 0.0001$)。在相同的处理条件下, B 型烟粉虱雌虫的耐热性要高于温室粉虱; 雄虫中也观察到相似的结果。

6.1.3 高温驯化对 B 型烟粉虱和温室粉虱耐热性影响

昆虫在非致死低温或高温范围内进行驯化(Acclimation), 可以获得增强的耐寒性或耐热性以抵御极端温度的伤害。研究发现, 非致死高温驯化可以显著的提高 B 型烟粉虱成虫对极端致死高温胁迫的抵抗力; 但高温驯化对温室粉虱成虫耐热性的提高没有显著影响。

6.1.4 热胁迫对 B 型烟粉虱和温室粉虱生殖适应性影响

将 B 型烟粉虱和温室粉虱的成虫在不同温度(37℃、39℃、41℃、43℃、45℃)下暴露 1h 后对其产卵前期没有影响, 均在 2d 左右开始产卵。热胁迫对 B 型烟粉虱成虫寿命和产卵量没有显著影响; 但温室粉虱成虫在 43℃ 以上高温下暴露 1h, 寿命显著缩短, 产卵量随着暴露温度的升高显著降低, 43℃ 暴露 1h 后几乎停止了产卵活动。两种粉虱的雌雄成虫经过高温暴露后其后代无论是卵的孵化率还是总的存活率均随着暴露温度的升高而降低。B 型烟粉虱成虫经过 43℃ 高温暴露后, 其后代中雄虫比例显著增加; 温度对温室粉虱后代性比没有影响, 其后代雌虫所占比例一直在 54% 左右。

6.1.5 B 型烟粉虱和温室粉虱 hsp70 cDNA 片段克隆

成功克隆了 B 型烟粉虱热激蛋白 hsp70cDNA 片段和温室粉虱 hsp70 cDNA 片段, 发现 hsp70 家族具有较高的保守性。

6.1.6 建立了检测粉虱 hsp70 表达实时定量检测体系

以含有 B 型烟粉虱 hsp70 基因片段的质粒为模板, 用 TaqMan-MGB 探针和特异性引物成功构建了 B 型烟粉虱热激蛋白 hsp70 基因的实时荧光定量 RT-PCR 检测体系, 并检测高温胁迫及气温变化时 B 型烟粉虱成虫体内 hsp70 基因表达水平的变化。结果表明, 高温对 B 型烟粉虱体内 hsp70 基因表达具有诱导作用, 在 37-41℃ 范围内, hsp70 基因的表达量随着温度的升高而升高, 在 41℃ 时达到最高峰; 随后随着温度升高到 43℃ 和 45℃, 粉虱体内 hsp70 基因的表达量迅速降低。B 型烟粉虱成虫体内 hsp70 基因表达随着气温的变化发生变化: 上午到中午随着气温的升高, B 型烟粉虱体内 hsp70 基因表达量也随之上升; 傍晚气温降低时, hsp70 基因表达量也随之下降。

6.2 展望

外来入侵种对温度胁迫耐受能力的高低对其入侵新环境后的扩散以及种群动态具有重要影响 (Barthell et al., 2002; 陈兵, 2003)。例如, 南美斑潜蝇和美洲斑潜蝇是先后入侵我国的重要害虫, 其地理分布和季节发生与它们的耐寒性和耐热性差异密切相关 (陈兵, 2003)。入侵美国加州的切叶蚁 *Megachile apicalis* (Spinola) 和 *M. rotundata* (Fabricius) 在加州的分布也与它们的耐高温能力种间差异相一致 (Barthell et al., 2002)。我们的研究证明, B 型烟粉虱和温室粉虱对高温的适应性存在差异, 这对它们种群季节动态格局和分布有重要影响; 并从生物学和分子生物学的不同角度揭示了 B 型烟粉虱对高温胁迫的反应及内在的分子机制, 阐明了耐热性在 B 型烟粉虱种群发生中的重要作用。这对揭示外来物种种群扩张、种间替代和种群生态预测均有重要的理论和实践意义。但目前仍有许多关于 B 型烟粉虱对热胁迫适应性方面的科学问题有待解决。首先, 耐热性调节机理研究。如 B 型烟粉虱入侵我国后经过长期驯化后其耐热性或耐寒性是否存在变化等。其次, 热胁迫对生殖适合度影响还有待深入研究。如高温对雌雄个体生殖适应性影响的差异; 长期驯化对有机体生殖适应性的影响等。第三, 不同热激蛋白家族在 B 型烟粉虱热胁迫适应性方面的作用, HSPs 之间的互作对 B 型烟粉虱耐热性的影响以及 HSPs 的调控机理等。第四, 不同物种对环境胁迫耐受能力差异与 HSP70 调控的关系, 为揭示种间耐热性分化从分子水平提供充分的证据。第五, 通常生物对极端温度的耐受机制是非常复杂的, 除了热激蛋白之外, 多羟基化合物、脂类在生物抵抗温度胁迫方面也十分重要, 因此, 从多个角度去开展研究对全面了解 B 型烟粉虱耐热机制具有重要作用 (Never, 2000)。

通过本研究基础上的上述研究, 我们可以比较全面和客观地阐述 B 型烟粉虱热胁迫适应性在其种群入侵扩张中的作用, 并从生物学和分子生物学相结合的角度探讨了其机制, 为 B 型烟粉虱的综合治理和可持续控制提供了理论依据, 并丰富和发展了生物入侵学理论, 为研究其它有害入侵生物提供了借鉴。

6.3 本研究的创新点

(1) 对 B 型烟粉虱和温室粉虱的耐热性以及高温对两者的生殖适应性进行了比较研究, 阐明了两种粉虱对高温耐受能力的差异以及高温对粉虱生殖适应性的影响是导致两种粉虱种群动态存在差异的一个重要原因。

(2) 克隆了温室粉虱hsp70 cDNA片段，并提交到Genebank。

(3) 以含有B型烟粉虱hsp70片段的质粒为模板，用TaqMan-MGB探针和特异性引物成功构建了B型烟粉虱热激蛋白hsp70的实时荧光定量检测体系，并研究了B型烟粉虱实验种群hsp70表达与温室温度变化的关系，表明hsp70在B型烟粉虱抵抗环境高温胁迫方面可能具有重要作用。

参考文献

1. Abd-Rabou S., New records on whiteflies in Egypt. Egypt. J. Agric. Res., 1999, 77: 1143-1146.
2. Ahearn G.A., Changes in hemolymph properties accompanying heat death in the desert tenebrionid beetle *Centrioptera muricata*. Comparative Biochem. Physiol., 1970, 33: 845-857.
3. Ait-Aissa S., Porcher J.M., Arrigo A.P., Lambre C., Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. Toxicol. 2000, 145: 147-157.
4. Alamillo J., Almoguera C., Bartels D., Jordano J., Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Plant. Mol. Biol. 1995, 29: 1093-1099.
5. Alexandrov V.Y., Cells, molecules and temperature: conformational flexibility of macromolecules and Ecological adaptation. Springer-Verlag, NY., 1977.
6. Anderson A.R., Collinge J.E., Hoffmann A.A., Kellett M., McKechnie S.W., Thermal tolerance trade-offs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the hsr-omega gene in *Drosophila melanogaster*. Heredity, 2003, 90: 195-201.
7. Anderson J.F., Horsfall W.R., Thermal stress and anomalous development of mosquitoes (Diptera: Culicidae). I. Effect of constant temperature of dimorphism of adults of *Aedes stimulans*. J. Experimental Biol., 1963, 154: 67-107.
8. Azab A.K., Megahed M.M., El-Mirsawi D.H., On the biology of *Bemisia tabaci* (Genn.). Bull. Soc. Entomol. Egypt., 1971, 55: 305-315.
9. Bale J.S., Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. Philos.Trans. R. Soc. Lond. Ser. B., 2002, 357: 849-862.
10. Bale J.S., Masters G.J., Hodkinson I.D., Awmak C., Bezemer T.M., Brown V.K., Butterfield J., Buse A., Coulson J.C., Farrar J., Good J.G., Harrington R., Hartley S., Jones T.H., Lindroth R.L., Press M.C., Symnioudis I., Watt A.D., Whittaker J.B., Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. Global Change Biology, 2002, 8: 1-16.
11. Banks G.K., Colvin J., Chowda R.V., Maruthi M.N., Muniyappa V., Venkatesh H.M., Kiran Kumar M., Padma A.S., Beitia F.J., Seal S.E., First report of the *Bemisia tabaci* B biotype in India and an associated tomato leaf curl virus disease epidemic. Plant Dis. 2001, 85: 231.
12. Barthell J.F., Hranitz J.M., Thorp R.W., Shue M.K., 2002. High temperature responses in two exotic leafcutting bee species: *Megachile apicalis* and *M. rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). Pan-Pac. Entomol., 78, 235-246.
13. Basu A.N., *Bemisia tabaci* (Gennadius): Crop pest and principal whitefly vector of plant viruses. Westview Press, New Delhi, 1995.

14. Basu N., Todgham A.E., Ackerman P.A., Bibeau M.R., Nakano K., Schulte P.M., Iwama G.K., Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 2002, 295, 173 -183.
15. Beament J.W.L., The waterproofing mechanism in arthropods -The effect of temperature on cuticle permeability in terrestrial insects and ticks. *J. Exp. Biol.*, 1959, 36: 391-442.
16. Bedford I., Briddon R.W., Brown J.K., Rosell R.C., Markham P.G., Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 1994, 125: 311-325.
17. Bedford I.D., Briddon R.W., Markham P.G., Brown J.K., Rosell R.C., *Bemisia tabaci*-biotype characterization and the threat of this whitefly species to agriculture. In: Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases. BritishCrop Protection Council, Farnham, UK, 1992.
18. Bell C.H., Effect of high temperatures on larvae of *Ephestia elutella* (Lepidoptera: Pyralidae) in diapause. *J. Stored Product Research*, 1983, 19: 153-157.
19. Bellows T.S., Perring T.M., Gill R.J., Headrick D.H., Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1994, 87: 195-206.
20. Berdiales B., Bernal J.J., Saez E., Woudt B., Beitia F., Rodrigues-Cerezo E., Occurrence of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1999, 105: 211-215.
21. Berrigan D., Hoffmann A.A., Correlations between measures of heat resistance and acclimation in two species of *Drosophila* and their hybrids. *Biol. J. Linn. Soc.*, 1998, 64: 449-462.
22. Bettencourt B.R., Feder F.E., Cavicchi S., Experimental evolution of hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 1999, 53: 484-492.
23. Bettencourt B.R., Kim I., Hoffmann A.A., Feder M.E., Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila* hsp70 genes. 2002, *Evolution* 56:1796-1801.
24. Bijlsma R., Loeschcke V., Environmental Stress, Adaptation and Evolution. Birkhäuser Verlag, Basel, 1997.
25. Bird J.M., Hodkinson I.D., Species at the edge of their range: The significance of the thermal environment for the distribution of congeneric *Craspedolepta* species (Sternorrhyncha: Psylloidea) living on *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *Eur. J. Entomol.*, 1999, 96: 103-109.
26. Browder L.W., Pollock M., Heikkila J.J., Wilkes J., Wang T., Krone P., Ovsenek N., Kloc M., Decay of the oocyte-type heat-shock response of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 1987, 124: 19: 1-9.
27. Brown J.K., Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. *FAO Plant Prot. Bull.*, 1994, 42: 3-32.
28. Brown J.K., Frohlich D.R., Rossell R.C., The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann. Rev. Entomol.*, 1995, 40: 511-534.
29. Butler G.D. Jr., Henneberry T.J., *Bemisia tabaci* (Gennadius), a pest of cotton in the southwestern United States. *US Dept. Agric., Agric. Res. Serv. Tech. Bull.*, 1986, 1701: 19.

30. Butler G.D.Jr, Henneberry T.J., Clayton T.E., *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): Development, oviposition, and longevity in relation to temperature. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1983, 76: 310-313.
31. Butler G.D.Jr, Henneberry T.J., Wilson F.D., *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton: adult activity and cultivar oviposition preference. *J. Econ. Entomol.*, 1986, 79: 350-354.
32. Byrne D.N., Bellows T. S., Whitefly biology. *Annu. Rev. Entomol.* 1991, 36: 431-457.
33. Camille P. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 2006, 37: 637-69.
34. Campbell B.C., Stephen-Campbell J.D., Gill, R., Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetic assessment. In: Gerling D., Mayer R.T., eds. *Bemisia: 1995 Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept, UK, 1996.
35. Canon R.C., The implications of predicted climate change for insect pests in the UK, with emphasis on non-indigenous species. *Global Change Biology*, 1998, 4: 785-796.
36. Cavicchi S., Guerra D., La Torre V., Huey R.B., Chromosomal analysis of heat-shock tolerance in *Drosophila melanogaster* evolving at different temperatures in the laboratory. *Evolution*, 1995, 49: 676-684.
37. Charlotte D.F., May P.M., Nicole A., Molecular cloning of a cDNA encoding the amphibian pleurodeles waltl 70-kDa heat-shock cognate protein. *Biochem. Bioph. Res. Com.* 1997, 238: 159-164.
38. Chen B., Kang L., Cold hardiness and supercooling capacity in the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis*. *CryoLetters*, 2002, 23: 173-182.
39. Chen C.P., Lee R.E., Denlinger D.L., A comparison of the response of tropical and temperate flies (Diptera: Sarcophagidae) to cold and heat stress. *J. Comparative Physiol. (part B)*, 1990, 160: 543-547.
40. Chen C.P., Lee R.E., Denlinger D.L., Cold shock and heat shock: A comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures. *Physiol. Entomol.*, 1991, 16: 19-26.
41. Chermiti B., Braham M., Cenis J.L., Alonso C., Beitia F., Albajes R., Carnero A., Presence in Tunisia of the biotypes "B" and "non B" of *Bemisia tabaci* (homoptera: aleyrodidae) and of their associated parasitoids. *Bull. OILB/SROP*, 1997, 20: 108-113.
42. Cock M.J.W., *Bemisia tabaci*: a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography. Ascot, UK, FAO/CAB, 1986.
43. Collins P.L., Hightower L.E., Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat-shock) messenger-RNAs and proteins. *J. Virol.*, 1982, 44: 703-707.
44. Cossins A.R., Bowler K., *Temperature Biology of Animals*. Chapman and Hall, NY., 1987.
45. Costa H.S., Brown J.K., Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomol. Exp. Appl.*, 1991, 61: 211-219.

46. Costa H.S., Johnson M.W., Ullman D.E., Omer A.D., Tabashnik B.E., Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): analysis of biotypes and distribution in Hawaii. *Environ. Entomol.*, 1993, 22: 16-20.
47. Craig E.A., The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1985, 18: 239-280.
48. Dahlgaard J., Loeschcke V., Effects of inbreeding in three life stages of *Drosophila buzzatii* after embryos were exposed to a high temperature stress. *Heredity*, 1997, 78: 410-416.
49. Dahlgaard J., Loeschcke V.P., Michalak J., Induced thermotolerance and associated expression of the heat -shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Fun. Ecol.*, 1998, 12: 786-793.
50. Danks H.V., The wider integration of studies on insect cold hardiness. *Eur. J. Entomol.*, 1996, 93: 383-403.
51. Dantsing E.M., Shenderovska L.P., Cotton whitefly. *Zashch. Rast.*, 1988, 12: 40.
52. De Barro P. J., Driver F., Trueman J.W.H., Curran J., Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2000, 16: 29-36.
53. De Barro P.J., Hart P.J., Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res.*, 2000, 90: 103-112.
54. De Barro P.J., Liebrechts W., Carver M., Distribution and identity of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in member countries of the secretariat of pacific community. *Aust. J. Entomol.*, 1998, 37: 214-218.
55. Deitch E.A., Beck S.C., Cruz N.C., Demaio A., Induction of heat-shock gene-expression in colonic epithelial-cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin. *Crit. Care.Med.*, 1995, 23: 1371-1376.
56. Delatte H., Reynaud B., Granier M., Thornary L., Lett J.M., Goldbach R., Peterschmitt M., A new silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. *Bull Entomol Res.* 2005, 95: 29-35.
57. Demichelis S., Bosco D., Manino A., Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Italy. *Can. Entomol.*, 2000, 132: 519-527.
58. Denlinger D.L., Joplin K.H., Chen C. P., Lee R.E., Cold shock and heat shock. *In: Lee R.E., Denlinger D.L., eds. Insects at low temperature.* Chapman and Hall, NY, 1991.
59. Denlinger D.L., Yocum G.D., Physiology of heat sensitivity. *In: Hallman G.J., Denlinger D.L. eds. Thermal sensitivity in insects and application in integrated pest management.* Westview Press, Boulder, Colorado, USA., 1998.
60. Dennis S.H., Agricultural insect pests of temperate regions and their control. Cambridge University Press, NY., 1987.
61. Diagnostic protocols for regulated pests, *Bemisia tabaci*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2004, 34: 281-288.

62. Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P., Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 39586-39591.
63. Dietz T.J., Somero G.N., The threshold induction temperature of the 90-kda heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89: 3389-3393.
64. Drew B., Miller D., Toop T., Hanna P., Identification expressed HSP's in blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) during heat and salinity stresses. *J. Shellfish Res.*, 2001, 20: 695-703.
65. Drost Y.C., van Lenteren J.C., van Roermund H.J.W., Life-history parameters of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to temperature and host plant: a selective review. *Bull. Entomol. Res.*, 1998, 88: 219-229.
66. Dura, J. M., Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 1981, 184: 381-385.
67. Ellsworth P.C., Martinez-Carrillo J.L., IPM for *Bemisia tabaci*: a case study from North America. *Crop Protection*, 2001, 20: 853-869.
68. Enkegaard A. *Encarsia formosa* parasitizing the poinsettia-strain of the cotton whitefly, *Bemisia tabaci*, on poinsettia: bionomics in relation to temperature. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, 69: 251-261.
69. Evgen'ev M.B., Zatsepina O.G., Garbuz D., Lerman D.N., Velikodvorskaya V., Zelentsova E., Feder M.E., Evolution and arrangement of the hsp70 gene cluster in two closely related species of the virilis group of *Drosophila*. *Chromosoma*, 2004, 113: 223-232.
70. Fader S.C., Yu Z., Spotila J.R., Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. *J. Thermal Biol.*, 1994, 19: 335-341.
71. Feder J. H., Rossi J. M., Solomon J., Solomon N., Lindquist S., The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.*, 1992, 6: 1402-1413.
72. Feder M.E., Blair N., Figuras H., Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae. *Funct. Ecol.*, 1997, 11: 90-100.
73. Feder M.E., Cartaño N.V., Milos L., Krebs R.A., Lindquist S.L., Effect of engineering hsp70 copy number on hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.*, 1996, 199: 1837-1844.
74. Feder M.E., Hoffmann G.E., Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999, 61: 243-282.
75. Feder M.E., Krebs R.A., Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insights from genetic engineering and natural variation. *EXS.*, 1997, 83: 155-173.
76. Fehrenbach E., Niess A.H., Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc. Immunol. Rev.*, 1999, 5: 57-77.
77. Fransen J.J., *Bemisia tabaci* in the Netherlands: Here to stay? *Pestic. Sci.*, 1994, 42: 129-134.

78. Frydenberg J., Hoffmann A.A., Loeschke V., DNA sequence variation and latitudinal associations in hsp23, hsp26 and hsp27 from natural populations of *Drosophila melanogaster*. Mol. Ecol., 2003, 12: 2025-2032.
79. Gehring W.J., Wehner R., Heat Shock Protein Synthesis and Thermotolerance in *Cataglyphis*, an Ant from the Sahara Desert Biozentrum, University of Basel, Switzerland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995, 92: 2994-2998.
80. Gilchrist G.W., Huey R.B., The direct response of *Drosophila melanogaster* to selection on knockdown temperature. Heredity, 1999, 83: 15-29.
81. Ginzinger D.G., Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Exp. Hematol., 2002, 30: 503-512.
82. Gophna U., Ron E.Z., Virulence and the heat shock response. Int. J. Med. Microbiol. 2003, 292: 453-461.
83. Goto S.G., Kimura M.T., Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. J. Insect Physiol., 1998, 44: 1233-1239.
84. Goto S.G., Yoshida K.M., Kimura M.T., Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. J. Insect Physiol., 1998, 44: 1009-1015.
85. Greenspan R.J., Finn J. A. Jr., Hall J.C., Acetylcholinesterase mutants in *Drosophila* and their effects on the structure and function of the central nervous system. J. Comparative Neurol., 1980, 189: 741-774.
86. Guirao P., Beitia F., Cenis J.L., Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Bull. Entomol. Res., 1997, 87: 587-593.
87. Gupta R.S., Phylogenetic analysis of the 90 kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. Mol. Biol. Evol., 1995, 12: 1063-1073.
88. Hamilton E.W., McNaughton S.J., Coleman J.S., Molecular, physiological, and growth responses to sodium stress in C-4 grasses from a soil salinity gradient in the Serengeti ecosystem. Am. J. Bot., 2001, 88: 1258-1265.
89. Heinrich B., The Hot-Blooded Insects. Harvard University Press, Cambridge, 1993.
90. Hendrix D.L., Salvucci M.E., Polyol metabolism in homopterans at high temperature: accumulation of mannitol in aphids (Aphididae: Homoptera) and sorbitol in whiteflies (Aleyrodidae: Homoptera). Comp. Biochem. Physiol., 1998, 120: 487-494.
91. Hepburn H.R., Structure of the Integument. In: Kerkut G.A., Gilbert, L.I. eds. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol.3., Pergamon Press, Oxford, 1985.
92. Hochachka P.W., Somero G.N., Biochemical Adaptation. Princeton University Press, Princeton, 1984.

93. Hodkinson I.D., Bird J., Miles J.E., Bale J.S., Lennon J.J., Climatic signals in the life histories of insects: the distribution and abundance of heather psyllids (*Strophingia* spp.) in the UK. *Fun. Ecol.*, 1999, 13: 83-95.
94. Hoffman A.A., Watson M., Geographical variation in the acclimation responses of *Drosophila* to temperature extremes. *Amer. Naturalist*, 1993, 142: 93-113.
95. Hoffmann A.A., Acclimation: increasing survival at a cost. *Tree*, 1995, 10: 1-2.
96. Hoffmann A.A., Dagher H., Hercus M., Berrigan D., Comparing different measures of heat resistance in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 1997, 43: 393-405.
97. Hoffmann A.A., Parsons P.A., *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford, 1991.
98. Hoffmann A.A., Parsons P.A., The analysis of quantitative variation in natural populations with isofemale strains. *Genet. Select. Evol.*, 1988, 20: 87-98.
99. Hoffmann A.A., Sørensen J.G., Loeschcke V., Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Thermal Biol.*, 2003, 28: 175-216.
100. Horowitz A.R., Gerling D., Seasonal variation of sex ratio in *Bemisia tabaci* on cotton in Israel. *Environ. Entomol.*, 1992, 21: 556-559.
101. Horowitz A.R., Population dynamics of *Bemisia tabaci* (Gennadius) with special emphasis on cotton fields. *Agrie. Ecosyst. Environ.*, 1986, 17: 37-47.
102. Horrell A., Shuttleworth J., Colman A., Transcript levels and translational control of hsp70 synthesis in *Xenopus oocytes*. *Genes Dev.*, 1987, 1: 433-444.
103. Horsfall W.R., Anderson J.F., Brust R.A., Thermal stress and anomalous development of mosquitoes (Diptera: Culicidae) III. *Aedes sierrensis*. *Can. Entomol.*, 1964, 96: 1369-1372.
104. Huey R.B., Crill W.D., Kingsolver J.G., Weber K.E., A method for rapid measurement of heat or cold resistance of small insects. *Funct. Ecol.*, 1992, 6: 489-494.
105. Huey R.B., Kingsolver J.G., Evolution of resistance to high temperature in ectotherms. *Amer. Naturalist*, 1993, 142: 21-46.
106. Huey R.B., Partridge L., Fowler K., Thermal sensitivity of *Drosophila melanogaster* responds rapidly to laboratory natural selection. *Evolution*, 1991, 45: 751-756.
107. Human K.G., Gordon D.M., Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia*, 1996, 105: 405-412.
108. Jenkins M.E., Suzuki T.C., Mount D.W., Evidence that heat and ultraviolet radiation activate a common stress-response program in plants that is altered in the *uvh6* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Physiol.*, 1997, 115: 1351-1358.
109. Jenkins N.L., Hoffmann A.A., Limits to the southern border of *Drosophila serrata*: cold resistance, heritable variation, and trade-off. *Evolution*, 1999, 53: 1823-1834.
110. Jinn T.L., Chen Y.M., Lin C.Y., Characterization and physiological function of class I low molecular-mass, heat shock protein complex in soybean. *Plant Physiol.*, 1995, 108: 693- 701.

111. Jinn T.L., Wu S.H., Yeh K.W., Hsieh M.H., Yeh Y.C., Chen Y.M., Lin C.Y., Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins in vitro among plants. *Plant Cell Physiol.*, 1993, 1055-1062.
112. Jinn T.L., Yeh Y.C., Chen Y.M., Lin C.Y., Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 1989, 30: 463-469.
113. K sgaard, C.W., Vollmer, J., Dahlgaard, J., Loeschcke, V., Heat induced male sterility in *Drosophila buzzatii*: genetic variation among populations for the duration of sterility. *Drosophila Inf. Service*, 2000, 83: 5-8.
114. Kaiser J., Fighting back: stemming the tide of invading species. *Science*, 1999, 285: 1836-1841.
115. Kaufmann S.H.E., Schoel B., Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. In: Morimoto R.I., Tissie res A., Georgopoulos C., eds. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1994.
116. Khazaeli A.A., Tatar M., Pletcher S.D., Curtsinger J.W., Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *J. Gerontol: Biol. Sci.*, 1997, 52: 489-452.
117. Kimura M.T., Ohtsu T., Yoshida T., Awasaki T., Lin F.J., Climatic adaptations and distributions in the *Drosophila takahashii* species subgroup (Diptera: Drosophilidae). *J. Nat. History*, 1994, 28: 401-409.
118. Kiriyama M.T., Oka M., Takehana M., Kobayashi S., Expression of a small heat shock protein 27 (HSP27) in mouse skin tumors induced by UVB-irradiation. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24: 197-200.
119. K hler H.R., Eckwert H., The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure. 2. Joint toxicity and transfer to field situations. *Ecotoxicol.*, 1997, 6: 263-274.
120. K hler H.R., Zanger M., Eckwert H., Einfeldt I., Selection favours low Hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.*, 2000, 13: 569-582.
121. Krainacker D.A., Carey J.R., Maternal heterogeneity in primary sex ratio of three tetranychid mites. *Exp. Appl. Acarol.*, 1988, 5: 151-162.
122. Krebs R. A., Feder M. E., Natural variation in the expression of the heat shock protein HSP70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress. *Evolutions*, 1997a, 51: 173-179.
123. Krebs R.A., Bettencourt B.R., Evolution of Thermotolerance and Variation in the Heat Shock Protein, Hsp70. *Amer. Zool.*, 1999, 39: 910-919.
124. Krebs R.A., Feder M.E., Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chap.*, 1997b, 2: 60-71.

125. Krebs R.A., Feder M.E., Experimental manipulation of the cost of thermal acclimation in *Drosophila melanogaster*. Biol. J. Linn. Soc., 1998, 63: 593-601.
126. Krebs R.A., Loeschcke V., A genetic analysis of the relationship between life-history variation and heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. Heredity, 1999, 83: 46-53.
127. Krebs R.A., Loeschcke V., Resistance to thermal stress in preadult *Drosophila buzzatii*: variation among populations and changes in relative resistance across life stages. Biol. J. Linn. Soc., 1995, 56: 517-531.
128. Kristensen T.N., Dahlgaard J., Loeschcke V., Inbreeding affects Hsp70 expression in two species of *Drosophila* even at benign temperatures. Evol. Ecol. Res., 2002, 4: 1209-1216.
129. Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T., Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature, 1978, 275: 416-420.
130. Lee M.L., Ahn S.B., Cho W.S., Morphological characteristics of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and discrimination of their biotypes in Korea by DNA markers. Korean J. Appl. Entomol., 2000, 39: 5-12.
131. Lee R.E.Jr., Chen C.P., Denlinger D.L., A rapid cold hardening process in insects. Science, 1987, 238: 1415-1417.
132. Lepock J.R., Cheng K.H., Al-Qysi H., Sim I.O., Koch C.J., Kruuv J., Hyperthermia-induced inhibition of respiration and mitochondrial protein denaturation in CHL cells. Int. J. Hyperthermia, 1987, 3: 123-132.
133. Levins R., Thermal acclimation and heat resistance in *Drosophila* species. Amer. Naturalist, 1969, 103: 483-499.
134. Li Q.B., Haskell D.W., Guy C.L., Coordinate and noncoordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. Plant. Mol. Biol., 1999, 39: 21-34.
135. Lima L.H.C., Campos L., Moretzsoh N.M.C., Navia D., Oliveira M.R.V., Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. Gen. Mol. Biol., 2002, 25: 217-223.
136. Lima L.H.C., Moretzohn M.C., Oliveira M.R.V., Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. Genet. Mol. Biol., 2000, 23: 1-5.
137. Lindquist S. 1986. The heat-shock response. Annual Review Biochem., 55: 1151-1191.
138. Liu T.X., Oetting R.D., Buntin G.D., Evidence of interspecific competition between *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) and *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) on some greenhouse-grown plants. J. Entomol. Sci., 1994, 29: 55-65.
139. Loeschcke V., Krebs R.A., Barker J.S.F., Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. Biol. J. Linn. Soc., 1994, 52: 83-92.
140. Ma E., Haddad G.G., Anoxia regulates gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. Mol. Brain Res., 1997, 46: 325-328.

141. Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans H., Clout M., Bazzaz F.A., Biotic invasion: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol. Applic.*, 2000, 10: 689-710.
142. Malcolm N.L., Molecular determinants of obligate psychrophily. *Nature*, 1969, 221: 1031- 1033.
143. Mark H., 1999. The Biology and Management of Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) on Greenhouse Grown Ornamentals. [WWW document]. URL <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>.
144. Markham P., Bedford J.D., Liu S., Frolich D.F., Rossel R., Brown J.K., The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). In: Gerling D., Mayer R.T., eds. *Bemisia*: 1995. Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. Intercept, UK, 1996.
145. Martin N.A., Whitefly: biology, identification and life cycle. Crop and food research, 1999. <http://www.crop.cri.nz>
146. Martinez J., Perez-Serrano J., Bernadina W.E., Rodriguez-Caabeiro F., Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiol.*, 2001, 43: 293-302.
147. McColl G., Hoffmann A.A., McKechnie S.W., Response to two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1996, 143: 1615-1627.
148. Merino S., Martínez J., Barbosa A., Møller A.P., de Lope F., Pérez J., Rodríguez-Caabeiro F., Increase in a heat-shock protein from blood cells in response of nestling House Martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia*, 1998, 116:343–347.
149. Morimoto R., Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev.*, 1998, 12: 3788-3796.
150. Morimoto R.I., Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 1993, 259: 1409-1410.
151. Morrison W.W., Milkman R., Modification of heat resistance in *Drosophila* by selection. *Nature*, 1978, 273: 49-50.
152. Moseley P.L., Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J. Applied Physiol.*, 1997, 83: 1 413-1 417.
153. Mound L.A., Halsey S.H., 1978. Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. London: British Museum (Natural History), 1978, 340.
154. Mound L.A., Host-correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae.). *Proc. R. Soc. Lond. (A)*, 1963, 38: 171-180.
155. Muniz M., Gloria N., Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.*, 2001, 30: 720-727.
156. Mutero A., Bride J.M., Pralavorio M., Fournier D., *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase: Identification and expression of two mutations responsible for cold- and heat-sensitive phenotypes. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, 243: 699-705.

157. Nakai A., Morimoto R.I. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 1993, 13: 1983-1997.
158. Nakano K., Iwama G.K., The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.(part A)*, 133: 79-94.
159. Nazir A., Saxena D.K., Chowdhuri D.K., Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1621: 218-225.
160. Neven L.G., Physiological responses of insects to heat. *Postharv. Biol. Technol.*, 2000, 21: 103-111.
161. Oliveiraa M.R.V., Henneberry T.J., Anderson P., History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protect.*, 2001, 20: 709-723.
162. OTA (Office of Technology Assessment) Harmful non-indigenous species in the United States. Washington DC: OTA, US Congress, 1993.
163. Otsuka Y., Takano T.S., Yamazaki T., Genetic variation in the expression of the six hsp genes in the presence of heat shock in *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.*, 1997, 72: 19-24.
164. Parsell D.A., Lindquist S., Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
165. Parsell D.A., Lindquist S., The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 1993, 27: 437-496.
166. Patton Z.J., Krebs R.A., The effect of thermal stress on the mating behavior of three *Drosophila* species. *Physiol. Biochem. Zool.*, 2001, 74: 783-788.
167. Perring T.M., Cooper A.D., Rodriguez R.J., Farrar C.A., Bellows T.S.Jr., Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 1993a, 259: 74-77.
168. Perring T.M., Farrar C.A., Bellows T.S., Cooper A.D., Rodriguez R.J., Evidence for a new species of whitefly UCR findings and implications. *Calif. Agric.*, 1993b, 47: 7-8.
169. Perring T.M., The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protect.*, 2001, 20: 725-737.
170. Petr K., Karla A., Evžen W., Stress proteins: nomenclature, division and functions. *Biomed. Papers*, 2001, 145: 39-47.
171. Pimentel D., Lach L., Zuniga R., Morrison D., Environmental and economic costs of non-indigenous species in the United States. *BioScience*, 2000, 50: 53-65.
172. Polla B.S., A role for heat shock proteins in inflammation? *Immunol. Today*, 1988, 9: 134-137.
173. Quintero C., Cardona C., Ramirez D., Jimenez N., First report of biotype B of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Colombia. *Revista Colombiana de Entomologia.*, 1998, 24: 23-28.
174. Quintero C., Rendon F., Garcia J., Cardona C., Lopez A.A., Hernandez P., Species and biotypes of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) affecting annual crops in Colombia and Ecuador. *Revista Colombiana de Entomologia.*, 2001, 27: 27-31.

175. Ramos N.E., Neto A.F., Arsénio S., Mangerico E., Stigter L., Fortunato E., Fernandes J.E., Lavadinho A.M.P., Louro D., Situation of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* in protected tomato crops in Algarve (Portugal). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2002, 32: 11-15.
176. Reiber C.L., Birchard G.F., Effect of temperature on metabolism and hemolymph pH in the crab *Stoloczia abbotti*. J. Thermal Biol., 1993, 18: 49-52.
177. Reitz S.R., Trumble J.T., Competitive displacement among insects and arachnids. Annu.Rev. Entomol., 2002, 47: 435-465.
178. Rinehart J. P., Yocum G. D., Denlinger D. L. , Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. Insect Biochem.Mol. Biol., 2000, 30: 515-521.
179. Rinehart J.P., Denlinger D.L., Rivers D.B., Upregulation of transcripts encoding select heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* in response to venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. J. Invertebr. Pathol., 2002, 79: 62-63.
180. Ritossa F., A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia, 1962, 18: 571-573.
181. Ropp M., Courgeon A.M., Calvayrac R., Bestbelpomme M., The possible role of the superoxide ion in the induction of heat-shock and specific proteins in aerobic *Drosophila* cells during return to normoxia after a period of anaerobiosis. Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983, 61: 456-461.
182. Ruesink J.L., Parker I.M., Groom M.J., Kareiva P.M., Reducing the risks of nonindigenous species introductions. Bioscience, 1995, 45: 465-477.
183. Russell L.M., Hosts and distribution of five species of *Trialeurodes* (Homoptera: Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Amer., 1963, 56: 149-153.
184. Russell L.M., Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Bull. Brooklyn Entomol. Soc., 1957, 52: 122-123.
185. Russell L.M., The North American species of whiteflies of the genus *Trialeurodes*. US Dep. Agric. Misc. Pub., 1948, 635, 1-85.
186. Saavedra C., Tung K.S., Amberg D.C., Hopper A.K., Cole C.N., Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev., 1996, 10: 1608-1620.
187. Salvucci M.E., Hendrix D.L., Wolfe G.R., Effect of high temperature on the metabolic processes affecting sorbitol synthesis in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. J.Insect Physiol., 1999, 45(1): 21-27.
188. Salvucci M.E., Sorbitol accumulation in whiteflies: evidence for a role in protecting proteins during heat stress. J. Therm. Biol., 2000, 25: 353-361.
189. Salvucci M.E., Stecher D.S., Henneberry T.J., Heat shock proteins in whiteflies, an insect that accumulates sorbitol in response to heat stress. J. Thermal Biol., 2000, 25: 363-371.
190. Schuster D.J., Mueller T.F., Kring J.B., Price J.F., Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. HortScience, 1990, 25: 1618-1620.

191. Secker A.E., Bedford I.A., Markham P.G., William M.E.C., Squash, A reliable field indicator for the presence of B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. In: Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases. BritishCrop Protection Council, Farnham, UK.,1998.
192. Sejerkilde M., Sørensen J.G., Loeschcke V., Effects of cold- and heat-hardening on thermal resistance and Hsp70 expression in *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol., 2003, 49: 719-726.
193. Sherman M.Y., Goldberg A.L., Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. Neuron, 2001, 29: 15-32.
194. Shim J.K., Jung D.O., Park a J.W., Kim D.W., Ha D.M., Lee K.Y., Molecular cloning of the heat-shock cognate 70 (Hsc70) gene from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its expression in response to heat shock and starvation. Comp. Biochem. Physiol.(Part B), 2006, 145: 288-295.
195. Shukla R M., Chand G., Saini M.L., Effect of malathion resistance on tolerance to various environmental stresses in rust-red flour beetle (*Tribolium castaneum*). Indian J. Agric. Sciences, 1989, 59: 778-780.
196. Silbermann R., Tatar M., Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. Evolution, 2000, 54: 2038-2045.
197. Silva S.C., Behavior of the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii* B&P) in the cotton crop on the coast of Hermosillo, Sonora. In: Proceedings of the International Cotton Pest Work Committee. California Dept. Food and Agric, Sacramento, 1997.
198. Skidmore R., Gutierrez J.A., Guerriero V., Kregel K.C., Hsp70 induction during exercise and heat-stress in rats - role of internal temperature. Am. J. Physiol., 1995, 268: 92-97.
199. Skinner R.H., Response of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) to water and nutrient stressed cotton. Environ. Entomol., 1996, 25: 401-406.
200. Solomon J.M., Rossi J.M., Golic K., McGarry T., Lindquist S., Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. The New Biologist, 1991,3: 1106-1120.
201. Sonna L.A., Fujita J., Gaffin S.L., Lilly C.M., Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. J. Appl. Physiol., 2002, 92: 1725-1742.
202. Sørensen J.G., Dahlgaard J., Loeschcke V., Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. Funct. Ecol., 2001, 15: 289-296.
203. Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V., The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecol. Lett., 2003, 6: 1-13.
204. Sørensen J.G., Loeschcke V., Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. J. Insect Physiol., 2001, 47: 1301-1307.

205. Sørensen J.G., Loeschcke V., Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. Ecol. Lett., 2002, 5: 16-19.
206. Sørensen J.G., Michalak P., Justesen J., Loeschcke V., Expression of the heat-shock protein Hsp70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. Hereditas, 1999, 131: 155-164.
207. Spees J.L., Chang S.A., Snyder M.J., Chang E.S., Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. Biol. Bull., 2002, 203: 331-337.
208. Stanley S.M., Parsons P.A., Spence G.E., Weber L., Resistance of species of the *Drosophila melanogaster* subgroup to environmental extremes. Aust. J. Zool., 1980, 28: 413-421.
209. Steinert S.A., Pickwell G.V., Induction of Hsp70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. Mar. Environ. Res., 1993, 35: 89-93.
210. Stephanou G., Alahiotis S.N., Non mendelian inheritance of ‘‘heat-sensitivity’’ in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 1983, 103: 93-107.
211. Stone D.E., Craig E.A., Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol., 1990, 10: 1622-1632.
212. Stratman R., Markow I.A., Resistance to thermal stress in desert *Drosophila*. Fun. Ecol., 1998, 12: 965-970.
213. Sun W.N., Montagu M.V., Verbruggen N., Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochim. Biophys. Acta., 2002, 1577(1): 1-9.
214. Tammariello S.P., Rinehart J.P., Denlinger D.L., Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. J. Insect Physiol., 1999, 45: 933-938.
215. Tatar M., Evolution of senescence: Longevity and the expression of heat shock proteins. Amer. Zool., 1999, 39: 920-927.
216. Tedengren M., Olsson B., Bradley B., Zhou L.Z., Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. Hydrobiologia, 1999, 393: 261-269.
217. Tissières A., Mitchell A.K., Some new proteins induced by temperature shock in *Drosophila*. J. Mol. Biol., 1974, 84: 389-398.
218. Tissières A., Mitchell H.K., Tracy U.M., Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol., 1974, 84: 389-398.
219. Toscano N.C., Castle S.J., Henneberry T.J., Prabhaker N., Persistent silverleaf white.y exploits desert crop systems. Calif. Agr., 1998, 52: 29-33.
220. Traboulsi R., *Bemisia tabaci*: a report on its pest status with particular reference to the near east. FAO Plant Prot. Bull., 1994, 42: 33-58.
221. Trautinger F., KindasMugge I., Knobler R.M., Honigsmann H., Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. J. Photochem. Photobiol. B-Biol., 1996, 35: 141-148.

222. Trotter E.W., Kao C.M.F., Berenfeld L., Botstein D., Petsko G.A., Gray J.V., Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 44817-44825.
223. Tsueda H., Koji T., Differences in spatial distribution and life history parameters of two sympatric whiteflies, the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) and the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring), under greenhouse and laboratory conditions. *Appl. Entomol. Zool.*, 1998, 33: 379-383.
224. Ulmasov H.A., Karaev K.K., Lyashko V.N., Evgenev M.B., Heat-shock response in camel (*Camelus dromedarius*) blood-cells and adaptation to hyperthermia. *Comp. Biochem. Physiol.(part B)*, 1993, 106: 867-872.
225. van Lenteren J.C., Noldus L.P.J.J., Whitefly-plant relationships: behavioural and ecological aspects. In: Gerling D., eds. *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. Intercept Ltd., Andover, UK, 1990, 47-89.
226. van Roermund H.J.W., van Lenteren J.C., Life-history parameters of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and the parasitoid *Encarsia formosa*. Wageningen Agricultural University Papers, 1992.
227. Velazquez J.M., Sonoda S., Bugaisky G., Lindquist L., Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell Biol.*, 1983, 96: 286-290
228. Vollmer J.H., Sarup P., Kærsgaard C.W., Dahlgaard J., Loeschcke V., Heat and cold induced male sterility in *Drosophila buzzatii*: genetic variation among populations for the duration of sterility. *Heredity*, 2004, 97: 257-262.
229. Wagner T.L., Temperature-dependent development, mortality, and adult size of sweetpotato whitefly biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton. *Environ. Entomol.*, 1995, 24: 1179-1188.
230. Wang K., Tsai J.H., Temperature effect on development and reproduction of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 1996, 89: 375-384.
231. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A., Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends Plant Sci.*, 2004, 9: 244-252.
232. Werner I., Nagel R., Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipodes exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and flouranthene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, 16: 2393-2403.
233. Wheeler J.C., King V., Tower J., Sequence requirements for upregulating expression of *drosophila* hsp70 transgenes during aging.. *Neurobiol. Aging*, 1999, 20: 545-553.
234. Whelan J.A., Russell N.B., Whelan M.A., A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immu. Meth.*, 2003, 278(1-2): 261-269.
235. White P.S., Biodiversity and the exotic species threat. In: Tennessee Exotic Pest Plant Council. *Exotic Pests of Eastern Forests*. USDA Forest Service, Nashville, TN, 1997.
236. Whyard S., Wyatt G.R., Walker V.K., The heat shock response in *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol. (Part B)*, 1986, 156: 813-817.

237. Wolfe G.R., Hendrix D.L., Salvucci M.E., A thermoprotective role for sorbitol in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. J. Insect Physiol., 1998, 44: 597-603.
238. Wu X.X., Li Z.X., Hu D.X., Shen Z.R., Identification of Chinese opulations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) by analyzing ribosomal ITS1 sequence. Progress in Natural Science, 2003, 13: 276-281.
239. Xu R.M., Status of the occurrence and distribution of the sweet potato whitefly (*Bemisia tabaci*) in China. In Gerling D., Mayer R.T., eds. *Bemisia*: 1995. Taxonomy, biology, ecology, control and management. Andover. Intercept., 1996.
240. Yang D.R., Lu X.F., Zhang W.G., He F.S., Biochemical changes in primary culture of skeletal muscle cells following dimethoate exposure. Toxicol., 2002, 174: 79-85.
241. Yocum G.D., Denlinger D.L., Anoxia blocks thermotolerance and the induction of rapid cold hardening in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. Physiol. Entomol., 1994, 19: 152-158.
242. Yocum G.D., Ždárek J., Joplin K.H., Lee R.E., Smith D.C., Manter K.D., Denlinger D.L., Alteration of the eclosion rhythm and eclosion behavior in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, by low and high temperature stress. J. Insect Physiol., 1994, 40: 13-21.
243. Yokomi R.K., Hoelmer K.A., Osborne L.S., Relationship between the sweetpotato whitefly and the squash silverleaf disorder. Phytopath., 1990, 80: 895-900.
244. Zhao Q., Wang J.H., Levichkin I.V., Stasinopoulos S., Ryan M.T., Hoogenraad N.J., A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. EMBO J., 2002, 21: 4411-4419.
245. 蔡蕾, 于之的, 王捷, 王德辉, 中国防治外来入侵物种的现状与管理评估. 环境保护, 2003, 8: 27-34.
246. 陈兵, 康乐, 生物入侵及其与全球变化的关系. 生态学杂志. 2003, 22: 31-34.
247. 陈兵, 外来斑潜蝇对热胁迫的适应: 温度、生理机制和生物地理分布. [博士学位论文]. 北京: 中国科学院动物研究所, 2003.
248. 陈革, 潘洁珍, 甘礼珍, 高温对家蚕蛹期生殖细胞与产卵质量的影响. 蚕业科学, 1986, 12: 110-113.
249. 陈艳华, 低温对 B 型烟粉虱和温室白粉虱生长发育的影响. [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
250. 陈夜江, 罗宏伟, 黄建, 杨阿龙, 湿度对烟粉虱实验种群的影响. 华东昆虫学报, 2001, 10(2): 76-80.
251. 褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 烟粉虱不同地理种群的 MtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 2005, 38: 76-85.
252. 董志峰, 生物安全问题. 中国家禽, 2001, 23(21): 19-20.
253. 郇庆炉, 薛香, 段爱旺, 日光温室内温度特点及其变化规律研究. 灌溉排水学报, 2003, 22(6): 50-53.
254. 郭慧芳, 陈长琨, 李国清, 陈文武, 王荫长, 高温胁迫影响雄性棉铃虫生殖力的生理机制. 棉花学报, 2002, 14: 85-90.

255. 郭慧芳, 陈长琨, 李国清, 高温胁迫对雄性棉铃虫生殖力的影响. 南京农业大学学报, 2000, 23: 30-33.
256. 郭建英, 万方浩, 谢丙炎, 陈万权, 农林外来入侵物种名录及其信息分析. 见: 万方浩, 郑小波, 郭建英, 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社, 2005.
257. 胡敦孝, 吴杏霞, 研究烟粉虱和温室白粉虱的区别. 植物保护, 2001, 27(5): 15-18.
258. 康乐, 外来种入侵的生态学效应. 科学时报, 1999, 4: 2.
259. 柯俊成, 陈秋男, 王重雄, 烟草粉虱种群(*Bemisia tabaci* species complex) 分类学综述. 台湾昆虫, 2002, 22: 307-341.
260. 李凤荪, 中国经济昆虫(中册). 湖南农学院丛刊(第1号), 1953.
261. 李俊杰, 桑润滋, 田树军, 冯志华, 热激蛋白在动物应激中的应用. 家畜生态, 2004, 25(3): 44-46.
262. 李振宇, 解焱, 中国外来入侵种. 北京: 中国林业出版社, 2002.
263. 李祖荫, 李兆华, 徐汝梅, 温室白粉虱的研究: 形态、生物学特性及各虫态历期. 北京师范大学学报(自然科学版), 1980, 3/4: 137-150.
264. 林克剑, 吴孔明, 魏洪义, 郭予元. 温度和湿度对 B 型烟粉虱发育、存活和生殖的影响. 植物保护学报, 2004, 31: 166-172.
265. 刘立云, 海南发现 B 型烟粉虱. 植物保护, 2002, 28(1): 61.
266. 刘世骥, 森林昆虫和病原物的害与益. 中国森林病虫, 2001, 1: 30-33.
267. 罗晨, 王素芹, 崔文清, 张芝利, 京郊粉虱与天敌的种群动态. 当代昆虫学研究. 中国昆虫学会成立 60 周年纪念大会暨学术讨论会论文集, 2004, 465-468.
268. 罗晨, 烟粉虱的寄主调查、生物学特性和分子系统学研究. [博士学位论文]. 北京: 农业大学, 2002.
269. 罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 利用 MtDNACO1 基因序列鉴定中国烟粉虱的生物型. 昆虫学报, 2002, 45: 759-763.
270. 罗晨, 张君明, 石宝才, 张帆, 张芝利, 北京地区烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 调查初报. 北京农业科学(增刊), 2000, 18: 42-47.
271. 罗晨, 张芝利, 2000. 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 研究概述. 北京农业科学(增刊), 18: 4-13.
272. 罗志义, 章伟年, 干国培, 棉田烟粉虱种群动态及杀虫剂的影响. 昆虫学报, 1989, 32: 293-299.
273. 马文斌, 王道勇, 赵丽君, 乌海市温室粉虱发生规律及其防治实验. 北京师范大学学报(自然科学版), 1999, 1: 34-35.
274. 邱宝利, 任顺祥, 肖燕, 温硕洋, 国内烟粉虱 B 生物型的分布其控制措施研究. 华东昆虫学报, 2003, 12(2): 27-31.
275. 孙旭彤, 张士瑾, 刘振辉, 李红岩, 热激蛋白研究概况及其在海洋生物中的研究进展. 海洋科学, 2002, 26(6): 24-27.
276. 万方浩, 郭建英, 王德辉, 中国外来入侵生物的危害与管理对策. 生物多样性, 2002a, 10(1): 119-125.

277. 万方浩, 郭建英, 王德辉, 中国外来入侵生物的现状、管理对策及风险评价体系。见: 王德辉, Jeffery A.A., 生物多样性与外来入侵种管理国际研讨会论文集. 北京: 中国环境科学出版社, 2002b.
278. 万方浩, 郑小波, 郭建英, 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社, 2005.
279. 王枫, 赵法汲, 高俊生, HSP70 高表达对 K562 细胞热耐力的影响. 中国公共卫生, 2000, 16: 687-688.
280. 王福祥, 美洲斑潜蝇的发生与综合防治. 农业科技通讯, 1997, 2: 34.
281. 王海鸿, B 型烟粉虱热休克蛋白基因的克隆和表达及其与胁迫耐受性关系的研究[博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院植物保护研究所, 2005.
282. 王荫长, 陈长琨, 卢中建, 李国清, 尤子平, 高温对小地老虎和粘虫精子发生和形成的影响. 昆虫学报, 1996, 39: 253-259.
283. 王荫长, 昆虫生物化学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
284. 王印来, 温室粉虱的综合防治. 昆虫知识, 1981, 18: 278-279.
285. 王子清, 温室中常见粉虱的识别. 昆虫知识, 1979, 16: 171—173.
286. 翁祖信, 冯兰香, 李宝栋, 朱国仁, 蔬菜病虫害诊断与防治. 天津: 天津科学技术出版社, 1994.
287. 吴孔明, 徐广, 郭予元, 华北北部地区棉田烟粉虱成虫季节性动态. 植物保护, 2001, 27(2): 14-15.
288. 吴杏霞, B 型烟粉虱在我国的发生、分布及分子鉴定. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2002.
289. 向玉勇, 李子忠, 张帆, 罗晨, 烟粉虱和温室粉虱的研究进展. 山地农业生物学报, 2004, 23 (4): 352-359.
290. 徐海根, 强胜, 韩正敏, 郭建英, 黄宗国, 孙红英, 何舜平, 丁晖, 吴海荣, 万方浩, 中国外来入侵物种的分布与传入路径分析. 生物多样性, 2004, 12 (6): 626 - 638.
291. 阎凤鸣, 李大建. 粉虱分类的基本概况和我国常见种的识别. 北京农业科学(增刊烟粉虱专辑), 2000, 18: 20-30.
292. 杨期和, 叶万辉, 邓雄, 许凯扬. 我国外来植物入侵的特点及入侵的危害. 生态科学, 2002, 21: 269-274.
293. 袁媛, 陈强, 陈思祇, 刘中来, 实时荧光定量 PCR 技术及其在生命科学领域中的应用. 海峡预防医学杂志, 2006, 12(4): 18-20.
294. 臧连生, B 型对浙江本地非 B 型烟粉虱的竞争取代及其行为机制. [博士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2005.
295. 臧连生, 刘银泉, 刘树生, 一种适合粉虱实验观察的新型微虫笼. 昆虫知识, 2005, 42: 329-331.
296. 张慧杰, 张战备, 雷逢进, 张丽萍. 重要经济害虫烟粉虱的发生. 昆虫知识, 2002, 39: 79-80.
297. 张芝利. 关于烟粉虱大发生的思考. 北京农业科学(增刊烟粉虱专辑), 2000, 18: 1-3.
298. 赵莉, 张荣, 肖艳, 崔元, 黄伟, 危害棉花的重要害虫烟粉虱在新疆发现. 新疆农业科学, 2000, 1: 27-28.

-
299. 周福才, 杜予州, 孙 伟, 于淦军, 龚伟荣, 陆自强, 任顺祥, 江苏省烟粉虱寄主植物调查及其危害评价. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2003, 24: 71-78.
300. 朱国仁, 温室蔬菜害虫的鉴别与治理. 中国蔬菜, 1983, 3: 15-18.

致 谢

本论文是在导师万方浩研究员的精心指导下完成的。从论文的选题、实验设计、计划实施到论文撰写都凝聚了导师大量的心血和汗水。万老师渊博的学识、宽阔的胸襟和孜孜不倦的敬业精神给我留下了深刻的印象，使我感悟到很多立身治学的态度和原则，受益匪浅，终身难忘。在此，我衷心地感谢万老师四年来对我的关心和指导。感谢师母杨晓玲老师在生活中给予了慈母般的关怀，我愿在今后的工作中加倍努力，不断进取，以不辜负导师和师母的教导和期望。

我衷心感谢课题组的全体老师和同学，在这个大家庭中学习和工作尤其开心。课题组严谨的科学氛围，融洽的师生关系和传帮带的良好作风帮助我顺利完成了论文计划的所有工作。感谢我的主管老师谢明副研究员对我生活的关心和工作上的支持，让我免除后顾之忧，全身心地投入到实验中去。感谢郭建英副研究员、张桂芬副研究员、刘万学副研究员、沈文君博士、王瑞博士、邱卫亮老师对我工作上的无私帮助和宝贵建议，他们乐观向上的进取精神、勇于创新的科研思维、忘我敬业的工作态度给我莫大的鼓舞，将是我今后工作和生活的榜样。感谢同窗桂富荣、杨国庆、张炬红博士，博士生黄文坤、杨宝东、蒋智林、吕志创、余昊，硕士生扈新萍、李东超、郭义、许三军、牛红榜、王雅男、顾渝娟、宫伟娜、李蕾、雷芳、陈艳华、王紫娟、应飞、张毅波、李丽、李新、严琦、严盈、钟良平、兰亚红、周志湘、刘金燕等，他们在我的学习、研究和生活等方面都给予了无数热情的帮助，难以一一表述，在此表示衷心的感谢！感谢山东农业大学硕士生曲鹏和山东莱阳农学院本科生李文波同学在生物学实验中的帮助。

美国德克萨斯州 A&M 大学的刘同先教授对英文稿件进行了审阅、斧正，并对本人工作给予了鼓励和建议，特此致谢。

感谢我丈夫多年来对我的理解与支持，特别是在我遇到困难和挫折的时候，他一直鼓励和支持着我，为我提供了坚强的后盾，对此，我表示最衷心地感谢。

值此论文完成之际，谨向所有关心和帮助过我的人们表示感谢，同时也向参加论文评审和论文答辩的专家们致以诚挚的敬意！

崔旭红 于北京

2007 年 6 月

个人简历

基本信息:

姓 名: 崔旭红, 女, 1977 年 10 月生, 湖北襄樊人。

政治面貌: 党员

学 历: 博士

专 业: 生物安全

研究方向: 生物入侵

邮 箱: xuhongcui@sina.com

通讯地址: 北京中关村南大街 12 号 中国农业科学院植物保护研究所(南区) (100081)

学习经历:

2003.9-2007.6 中国农业科学院研究生院 博士

2000.9-2003.6 华中农业大学植物科学技术学院 硕士

1996.9-2000.6 华中农业大学植物保护系 学士

攻读博士期间撰写和发表的文章:

1. **Cui Xu-hong**, Wan Fang-Hao, Xie Ming, Liu Tong-Xian. Effects of Heat shock on survival and fecundity of two whitefly species: *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* B biotype (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Insect Science (in press, SCI 杂志)
2. **崔旭红**, 谢明, 万方浩. 短时高温暴露对 B 型烟粉虱和温室粉虱存活以及生殖适应性的影响. 《中国农业科学》(已接收)
3. **崔旭红**, 谢明, 万方浩. B 型烟粉虱热激蛋白基因(hsp70)表达实时荧光定量检测. 《昆虫学报》(审稿中)
4. **崔旭红**, 陈艳华, 谢明, 万方浩. B 型烟粉虱和温室粉虱逆境存活特性研究. 《昆虫学报》(审稿中)
5. 陈艳华, **崔旭红**, 谢明, 万方浩. B 型烟粉虱和温室粉虱在低适温区条件下的生长繁殖特性研究. 《中国生态农业学报》(审稿中)
6. 郭建英, **崔旭红**, 外来入侵生物对我国经济的影响. 《大自然杂志》, 2004, 30-31.

参与《重要农林外来入侵物种的生物学与控制》(万方浩 郑小波 郭建英 主编, 科学出版社, 2005 年出版)的章节编写。