

荻草谷网蚜对低温胁迫响应的转录组学分析

王雪芹, 蒋月丽, 巩中军, 王恒亮, 武予清*

(河南省农业科学院植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 农业部华北南部有害生物治理重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 对荻草谷网蚜 *Sitobion miscanthi* 可能存在的低温应对机制进行了初步研究, 选用 3 龄若蚜, 通过转录组测序对低温处理组 (-7°C, 3 h, 记作 T) 和常温对照组 (22°C, 3 h, 记作 CK) 样品进行测序分析, 同时利用 qRT-PCR 对随机选择的 6 个耐寒性相关基因表达量进行测定。结果显示, 转录组测序、组装后共获得 28 333 个 unigenes, 在 GO 数据库中注释到 8 843 个 unigenes。低温胁迫后差异表达的 unigenes 数量为 936 个, 其中 508 个上调, 428 个下调。经 GO 功能注释和 KEGG 富集分析发现, 差异基因 (DEGs) 主要集中在碳代谢、氨基酸生物合成和缬氨酸亮氨酸异亮氨酸降解通路, 其中热激蛋白、海藻糖、性决定蛋白基因显著上调表达, 黑芥子酶基因显著下调表达。经 qRT-PCR 验证, 随机筛选的 6 个 DEGs 的定量结果与转录组测序结果趋势一致。综上, 本研究结果为进一步挖掘与荻草谷网蚜耐寒性相关基因提供理论基础。

关键词: 荻草谷网蚜; 低温胁迫; 黑芥子酶; 海藻糖; 热激蛋白

Transcriptome analysis of responses of *Sitobion miscanthi* to low temperature stresses

WANG Xue-Qin, JIANG Yue-Li, GONG Zhong-Jun, WANG Heng-Liang, WU Yu-Qing* (Henan Key Laboratory of Crop Pests Control, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southern Region of North China, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to reveal the adaptation mechanisms of *Sitobion miscanthi* to low temperature, transcriptome sequencing of *S. miscanthi* was performed, exposure to low temperature (-7°C) and normal temperature (22°C) for three hours with high throughput sequencing technology, and key unigenes of differential expression were screened. The gene function annotation and related metabolic pathway enrichment analysis were carried out. Meanwhile, six genes related to chill resistance of *S. miscanthi* were selected for real-time quantification PCR (qRT-PCR) to verify the results from transcriptome sequencing. Total 28 333 unigenes were sequenced and assembled, 8 842 unigenes were annotated in GO. Compared with the control, 936 unigenes were differentially expressed (508 up-regulated and 428 down-regulated). The differentially expressed genes were mainly involved in carbon metabolism and biosynthesis of amino acids, and valine, leucine and isoleucine degradation pathway, among which trehalose genes and heatshock protein genes and sex determination protein genes were up-regulated with myrosinase genes were down-regulated. The qRT-PCR results of six differentially expressed genes randomly screened were consistent with the transcriptome sequencing results. It was indicated that the transcriptome analysis results were reliable. In summary, this study systematically analyzed the related genes of *S. miscanthi* confronted by the low temperature, which may provide scientific basis for exploring the cold tolerance mechanism.

Key words: *Sitobion miscanthi*; low temperature stress; myrosinase; trehalose; heat shock protein

低温是昆虫生长过程中重要的非生物因素, 不仅能影响其正常发育还能引起昆虫地理分布的改变及越冬区的划分 (Bozinovic *et al.*, 2011; Estay *et al.*, 2011; Saedi *et al.*, 2012; Colinet *et al.*, 2015)。因此, 抗寒能力对于昆虫种群的繁殖和扩散具有重要意义 (Bale & Hayward, 2010)。为了应对低温胁迫带来的伤害, 当外界温度下降时昆虫将进行生理生化

基金项目: 国家小麦体系地下害虫岗位(CARS-3)

作者简介: 王雪芹, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为农业害虫综合防治, E-mail: totwxq@126.com

*通讯作者 Author for correspondence: 武予清, 男, 博士, 研究员, 从事植物保护研究工作, E-mail: yuqingwu36@hotmail.com

收稿日期 Received: 2024-02-20; 接受日期 Accepted: 2024-06-18

反应来应对低温,如通过积累糖原、脂肪、小分子糖类等小分子抗冻保护剂(Behroozi *et al.*, 2012; Bemani *et al.*, 2012; Nieminen *et al.*, 2013; 董亚新, 2021),从而提高自身的抗寒能力(欧阳芳和戈峰, 2014; Sun *et al.*, 2014; Lencioni *et al.*, 2015; 史彩华等, 2016);分子水平上,大量存在昆虫体内的基因能帮助其对抗环境温度的变化,如热激蛋白、抗冻蛋白、水通道蛋白等(Sejerkilde *et al.*, 2003; Philip *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2015)。Sun等(2014)发现低温环境中存在3种热激蛋白在大螟 *Sesamia inferens* 体内会上调表达;Qin等(2018)也发现西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 雌虫在低温胁迫下,其体内热激蛋白基因和 Fofcc7 显著上调表达。研究昆虫对低温应答的分子机制,能够更好地理解面对环境变化时,生物体是如何快速适应外界环境压力;并可利用基因工程等相关手段,来阻止或降低害虫应对低温物质的产生,开发相关的生物制剂,降低害虫在低温下的存活能力,达到治虫的效果(史彩华等, 2016)。

荻草谷网蚜 *Sitobion miscanthi* 作为我国麦区的优势种群(曹雅忠等, 2006; 马健等, 2008; Jiang *et al.*, 2019),通过刺吸小麦汁液引起小麦减产,传播大麦黄矮病引起小麦品质降低,严重的影响了我国麦区小麦的产量与品质(徐昭焕等, 2012; 王雪芹等, 2021)。荻草谷网蚜的耐寒性与其越冬区的划分密切相关,尽管许向利等(2020)、王雪芹等(2021)报道了该蚜在陕西、河南部分地区的低温适应性特点,然而有关荻草谷网蚜低温胁迫相关转录组水平的分子适应研究迄今还未见报道。本研究采用高通量转录组测序技术,对常温(22°C, 3 h, 对照组记作 CK)和低温胁迫(-7°C, 3 h, 处理组记作 T)后的荻草谷网蚜进行转录组测序分析,以期进一步了解荻草谷网蚜对低温的响应机制,为开发新型生物农药提供理论基础(史彩华等, 2016)。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试昆虫:荻草谷网蚜采集于河南省新乡市平原一体化示范区小麦田,实验室内于 22°C±0.5°C、相对湿度 65%、光周期 16 L : 8 D 的人工气候箱中饲养。

1.2 方 法

1.2.1 试虫处理

根据王雪芹等(2021)结果,本研究选择3龄荻草谷网蚜在-7°C进行3h低温胁迫作为处理组(T),22°C下处理3h作为对照组(CK)。选取无翅型荻草谷网蚜3龄若虫放于玻璃管中,每管30头,用纱布封好管口,共制备6管;分别取3管荻草谷网蚜3龄若虫于22°C、-7°C环境暴露3h,然后加入液氮速冻,放入-80°C超低温冰箱待用。

1.2.2 总 RNA 的提取、文库构建及测序

荻草谷网蚜测序工作委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。将收集好的整虫用 trizol (Ambion/Invitrogen, USA) 提取样品 RNA, 通过 Agilent 2100 bioanalyzer 精确检测 RNA 完整性;用通过质检的总 RNA 构建文库,每个样品设置3个重复,每个重复30头蚜虫,共构建6个 cDNA 文库。测序平台使用 Illumina NovaSeq 6000 (illumina, USA);对于无参考基因组的转录组分析,先将测序所得原始数据(Raw reads)进行过滤,测序错误率检查、GC 含量分布检查,获得后续分析使用的 clean reads,然后采用 Trinity (v2.4.0) 拼接成转录本(Grabherr *et al.*, 2011),再用 Corset (version 4.6) 程序对转录本进行层次聚类,去除冗余转录本后,以聚类后序列为参考,挑选每个基因中最长的转录本(Unigene)进行后续的功能注释和分析。

1.2.3 基因功能注释及差异基因分析

使用 BLAST 软件将测序所得的 unigene 序列与 Nr (NCBI non-redundant protein sequences)、NT (NCBI nucleotide sequences)、Pfam (protein family)、KOG (euKaryotic ortholog groups) 以及 GO (geneontology) 共 5 个数据库进行比对并得到功能注释信息。对原始的 read count 进行标准化 (normalization), 通过统计学模型进行假设检验概率 (P-value) 的计算, 来评估每个样品的基因表达水平。荻草谷网蚜转录组对照组与处理组样品中表达量差异达到两倍以上且 P 值 $\text{padj} < 0.05$ 的基因被筛选为差异基因。为进一步揭示荻草谷网蚜响应低温胁迫的分子机制, 对差异基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析, 本测序工作中 GO 富集采用 topGO (2.10.0) 软件, KEGG 富集采用 KOBAS (v2.0.12) 软件。

1.2.4 低温胁迫后荻草谷网蚜转录组测序数据验证

从测序返样中随机挑选 6 个差异表达基因, 以 18sRNA 为内参基因进行测序结果的 RT-qPCR 验证 (Yang *et al.*, 2014)。使用 Primer5.0 软件对各差异基因进行引物设计 (表 1), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成引物。PCR 反应体系为: 蒸馏水 6.4 μL , TOYOBO SYBR[®]Green Real-time PCR Master Mix (QPC-201) 10 μL , 上游引物 (10 μM) 0.8 μL , 下游引物 (10 μM) 0.8 μL , 样品溶液 2 μL , 总体系共 20 μL , 每个样品 3 个重复。qPCR 反应程序: 94°C60s, 94°C15s, 57°C15s, 40 个循环。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

转录本号 unigenes ID	引物序列 (5'-3') Primer sequences	基因描述 Gene description
Cluster-35.0	F: TGTCTTTCTGGCCAGATTGG R: CAACCGAGCTCAAATCGAAGT	胰岛素降解酶 Insulin-degrading enzyme
Cluster-6295.17595	F: TCCGTAACCATAACCCTCCGT R: CGGTGGATTCTACGACGAGG	-
Cluster-6295.16402	F: TGTAAGCTGTTTGGCCCGT R: GGCTTCGGATCGTGGAGATT	酰基辅酶 A 结合结构域蛋白 Acyl-CoA-binding domain
Cluster-1107.0	F: TCTTGCCTTCTTGGCCATA R: ACCAGCAGCGTCTGATCTTC	多聚泛素 Polyubiquitin
Cluster-6295.16242	F: CATGAGCGCGAAAAGACCAG R: AACGGTTTTTCGGTGGTCTCA	ATP 合酶亚基 ATP synthase subunit
Cluster-6295.16222	F: CATCCCTTGTCCGCTTCTGT R: ACCGCACCATATTGGATGCA	3,4-二羟基-2-丁酮激酶 3,4-dihydroxy-2-butanone kinase
18S rRNA	F: CCGCGAAACCGTCATTAATC R: GGAACCTCTGTCGGCATGTATTA	内参基因 Housekeeping gene

2 结果与分析

2.1 荻草谷网蚜转录组的测序与组装

对荻草谷网蚜-7°C和 22°C温度处理下质检合格的 RNA 样品进行文库构建, 经 Illumina NovaSeq 6000 平台高通量测序后, 获得约 17.5 G 原始数据, 对 clean reads 进行拼接后共获得 28 333 个 unigene, 总长度为 41 261 053 bp, 平均长度 1 456 bp, N50 长度为 2 699 bp。

2.2 荻草谷网蚜转录组的基因功能注释

通过与 Nr、NT、Pfam、KOG 以及 GO5 大数据库进行比对, 有 15 591 个 unigenes 获得了至少来自一个数据库的功能注释。与 Nr 数据库的比对结果显示, 荻草谷网蚜转录组中 57.2% unigenes 的注释信息来自玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*, 其次为豌豆蚜 *Acyrtosiphon*

pisum (11.1%)、桃蚜 *Myzus persicae* (7.8%)、高粱蚜 *Melanaphis sacchari* (7.0%)、棉蚜 *Aphis gossypii* (5.1%) 等近缘物种。

2.3 荻草谷网蚜注释基因分析

与 KOG 数据库进行比对发现, 获得的 unigenes 包含 RNA 加工与修饰、脂类转运、信号转导等 25 个蛋白类群, 比较全面地包含了荻草谷网蚜大部分的生命活动。其中一般功能预测、信号转导机制的 unigenes 较多, 分别为 891 个、719 个, 分别占 unigenes 总数的 14.91% 和 12.03%, 另外参与翻译后修饰、蛋白质转运、分子伴侣, 翻译核糖体结构和生物合成, 脂类代谢, 转录的 unigenes 较为丰富 (图 1)。

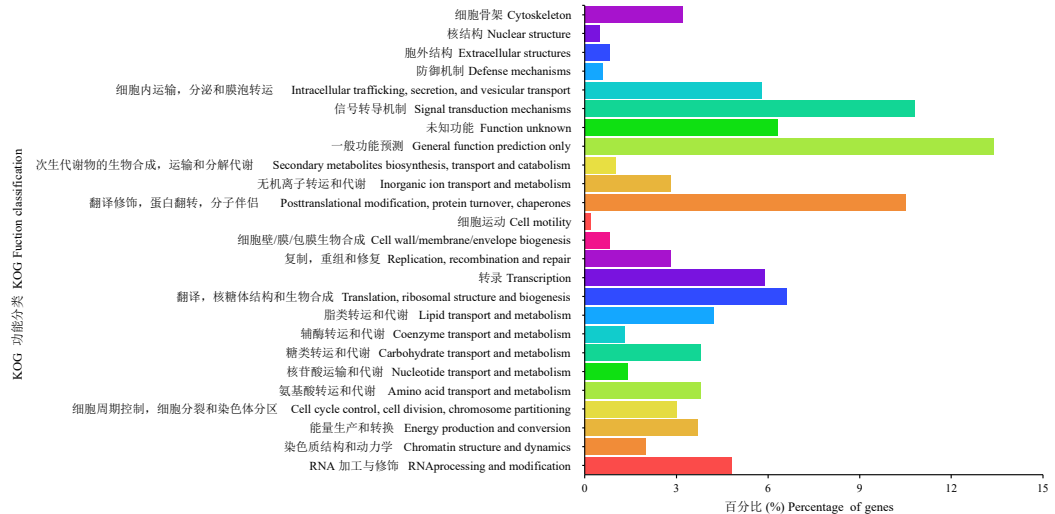


图 1 荻草谷网蚜 unigenes 的 KOG 分类分布图

Fig. 1 KOG functional classification of unigenes of *Sitobion miscanthi*

对 unigenes 进行 GO 功能数据库比对, 注释到序列可以分为 3 大类: 分子功能、细胞组分、生物过程的 42 个 GO 功能二级条目上; 其中以生物过程类别包含 25 个二级条目, 细胞过程、代谢过程的 unigenes 数量较多, 分别有 5 982 和 5 215 个, 划分到节律过程、氮素利用、生物矿化的较少; 细胞组分中注释到的二级条目较少, 共有 6 个, 细胞解剖实体的 unigenes 数量最多, 其次为胞内 unigenes 数量, 分别为 4 905 个和 2 788 个; 分子功能类别以绑定功能的 unigenes 数量最多, 其次为催化活性的 unigenes 数量, 分别为 5 601 个和 4 227 个 (图 2)。

2.4 荻草谷网蚜基因差异表达及功能分析

低温处理对荻草谷网蚜影响较大，-7°C处理 3 h 即可导致荻草谷网蚜大量基因的表达情况发生显著变化，荻草谷网蚜转录组差异表达的 unigenes 数量为 936 个，其中 508 个上调，428 个下调，上调的基因多于下调的基因数量。

2.4.1 差异表达基因的 GO 功能富集分析

在-7°C低温胁迫后荻草谷网蚜差异表达基因与 GO 数据库进行比对富集，参与跨膜转运蛋白活性的 DEGs 数目最多为 56 个，参与跨膜运输的次之为 33 个，参与氧化还原酶活性的 DEGs 数目较少为 28 个。根据 Padj 参数排序的前 20 位荻草谷网蚜低温胁迫差异表达基因的富集结果可知，显著差异表达基因发生于细胞壁组织，参与碳水化合物代谢过程、脂类代谢过程、氧化还原酶活性（图 4）。

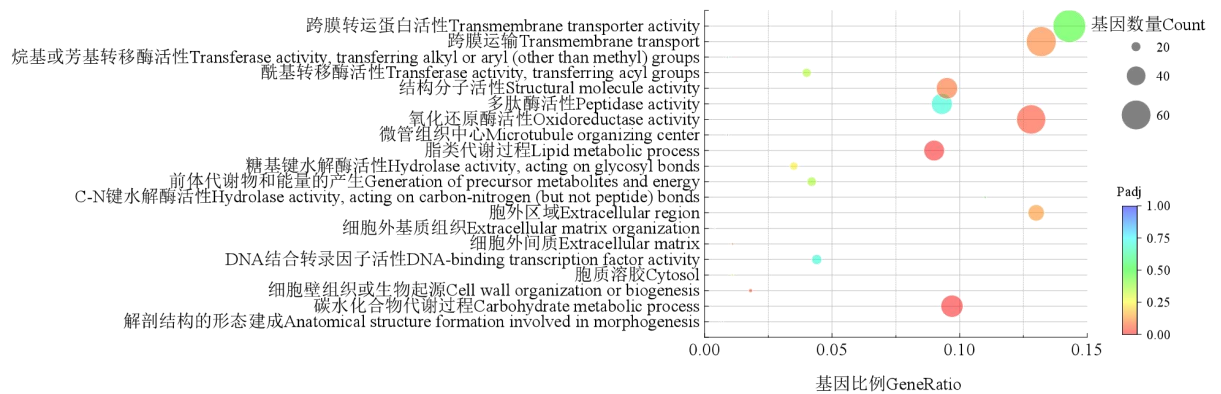


图 4 荻草谷网蚜差异表达 unigenes GO 功能分类

Fig. 4 GO functional classification of differentially expressed unigenes of *Sitobion miscanthi*

2.4.2 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

低温胁迫后差异表达的基因显著富集在 219 个 KEGG 通路，与 KEGG 通路相关的基因为 3 907 个，其中差异表达基因有 223 条；KEGG 功能富集发现低温胁迫下荻草谷网蚜下调表达基因（135 个）涉及到碳代谢和氨基酸生物合成、缬氨酸亮氨酸异亮氨酸降解、糖酵解/糖异生通路、脂肪酸的生物合成与降解、葡萄糖分解途径通路等（图 5）。其中黑芥子酶（Myrosinase, Myr）基因表达量显著下调，海藻糖（Trehalose）、热激蛋白（HSP）、性别决定蛋白基因表达量上调。

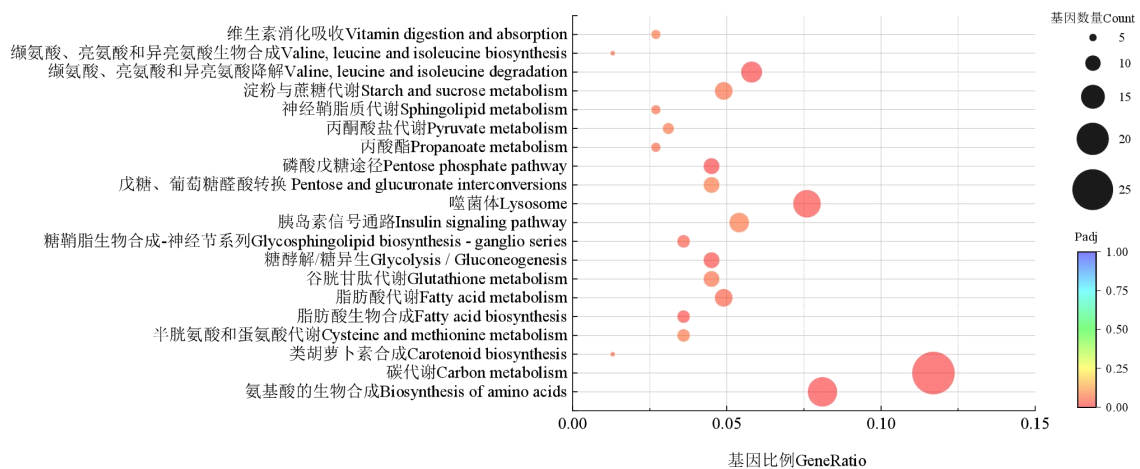


图 5 荻草谷网蚜 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment of the differentially expressed genes of *Sitobion miscanthi*

2.5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

随机选择 6 个差异表达 unigenes 进行 qRT-PCR 验证，其变化情况与转录组测序结果基

本一致，表明转录组测序得到的数据可靠；低温胁迫后，水解酶活性、代谢与能量产生相关的基因（unigenes ID 分别为 Cluster-35.0、Cluster-6295.17595、Cluster-6295.16402）表达上调；与核糖体蛋白质、跨膜转运等相关基因则下调（Cluster-1107.0、Cluster-6295.16242、Cluster-6295.16222）（图 6）。

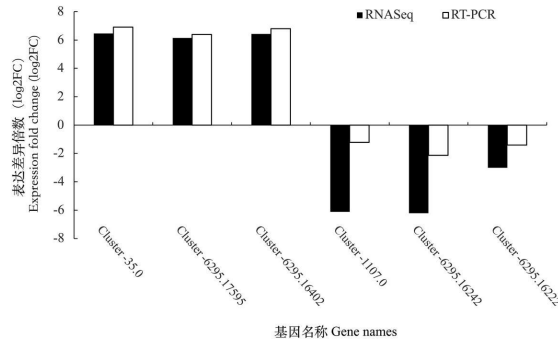


图 6 低温胁迫下荻草谷网蚜差异表达基因的实时定量验证

Fig. 6 Real-time quantitative verification of DEGs of *Sitobion miscanthi*

3 结论与讨论

荻草谷网蚜转录本共拼接得到 28 333 个 unigenes，有 8 843 个 unigenes 在 GO 数据库中注释，占 unigenes 总数的 31.21%，其中 116 个 unigenes 与已知参与温度胁迫的相关基因序列高度同源；本转录组测序分析为无参转录组分析，因此在 GO 数据库中能够被成功注释到的基因数量较少，荻草谷网蚜的转录组学研究目前还处于前期探索阶段，相关的基因功能数据较少，也无法进行有参转录组分析，这些因素都增加了基因注释的难度。将来应进一步完善未注释到的其他基因，为荻草谷网蚜的防治提供更多理论基础。

本转录组中 unigenes 经过 GO 数据库注释后，其中在生物过程和分子功能类别中最多的 unigenes 与低温胁迫下西花蓟马的转录组结果相似，都集中在代谢过程、催化活性等方面，而与西花蓟马的细胞组分类别有较大的不同（袁嘉雯等，2021）。李亦松等（2021）发现梨小食心虫 *Grapholita molesta* unigene 序列与 KEGG 数据库比对后，在细胞过程和环境信息处理两大类中，信号传导和运输与分解代谢通路富集的基因序列最多，本研究也发现荻草谷网蚜在经过低温胁迫后，在环境信息处理与细胞过程两个类别中以信号传导和运输与分解代谢通路的基因序列最多。

低温引起荻草谷网蚜糖基水解酶家族 1 (Glycosyl hydrolase family1, GH1) 表达量下降，这可能会导致昆虫体内葡萄糖含量的下降，阻止昆虫的生长发育。在本研究中荻草谷网蚜经过低温胁迫后，进行差异表达基因的 KEGG 分析，结果显示黑芥子酶 (Myrosinase, Myr) 基因表达量显著下调；彭媛媛（2021）发现当桃蚜 *Myzus persicae* 体内黑芥子酶降低时，其生长发育受阻，体型变小；由此推测可能是荻草谷网蚜在遭受低温胁迫时通过降低体内黑芥子酶含量来减缓自身的生长来抵抗外界不良环境的侵袭。

转录组差异分析结果表明，低温处理后，荻草谷网蚜体内海藻糖基因的表达发生了显著上调变化。海藻糖是由两个葡萄糖分子组成的的非还原性二糖，广泛存在于各种生物体中（Elbein *et al.*, 2003），是昆虫血淋巴中最重要的糖类，在昆虫体内主要是通过海藻糖合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 来催化合成（Meenakshi *et al.*, 2023）。海藻糖不但能为生物体提供能量，而且能够在高温、高寒等极端温度下在细胞表面形成独特的保护膜，来维持生物体的生长发育（Crowe *et al.*, 1990）。Jagdale 等（2005）发现，异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 经过 3 h 1°C 低温处理后，与 25°C 培养的异小杆线虫相比，处

理组线虫的海藻糖含量上升 6 倍；秦资等（2012）利用实时荧光定量 PCR 检测发现，异色瓢虫在梯度降温诱导下，*HaTPS* 的表达量随着温度的降低而显著升高，在降温和升温处理条件下，*HaTPS* 的表达量呈现先升高后下降的表达趋势；也有研究显示随着环境温度的降低，扁桃仁蜂 *Eurytoma amygdali* 体内海藻糖含量逐渐增加（Khanmohamadi *et al.*, 2016）；这些研究表明，海藻糖代谢在昆虫对抗低温胁迫中起着至关重要的作用，与本文研究结果一致。海藻糖作为几丁质合成的前体，其含量的变化间接影响着昆虫几丁质的合成，使用海藻糖酶或几丁质酶抑制剂调控几丁质合成与代谢通路进而影响害虫蜕皮，成为防治害虫的一种重要手段（王思彤等，2022）。

热激蛋白（HSP）作为一种保守的抗逆蛋白，在低温处理的荻草谷网蚜转录组中也上调表达，热激蛋白主要包含 4 个家族：HSP90，HSP70，HSP60 以及小热激蛋白 sHSP 基因家族（King & MacRae, 2015），在本转录组中表达最多的是热激 HSP70，在生物体遭受环境胁迫时，它与其他蛋白结合，可以减少蛋白质的错误折叠记录并降低其不稳定性，阻止或减少变性蛋白的积累，恢复细胞内肽链功能，维持细胞平衡且能够清除变性的蛋白质（Wallace *et al.*, 2015；Cheng *et al.*, 2016；Riback *et al.*, 2017；白月亮，2021；李寒等，2022）；Huang 等（2007）也发现叶蝉在 -7.5°C~-5°C 低温胁迫下，其 HSP20 及 HSP70 表达量上升来抵御低温。

荻草谷网蚜大多时间营孤雌生殖，钱幼亭等（1982）在河南省新乡地区秋末冬初发现其有性生殖阶段；刘健等（2003）通过比较三亚市、北京市、石河子市和越南胡志明市 4 地的棉蚜对光周期和温度的适应性，发现了不同地理种群的棉蚜对光照和温度的性蚜分化特点，利用低温胁迫诱导出棉蚜有性蚜。这些结果说明蚜虫在低温诱导下能够完成从雌蚜到雄蚜的性别转换。在本研究与性别决定蛋白的相关基因也有上调表达，这也与蚜虫在上述研究低温胁迫时可以出现性别转化的现象相吻合，为荻草谷网蚜越冬地的划分及其雄蚜可能出现的地区提供理论依据。

总之，随着分子生物学技术的不断发展，研究麦区主要害虫荻草谷网蚜对低温防御的分子应对机制，可以更深入的了解该虫的危害特性，可为该虫的测报提供理论参考。本研究结果指出了荻草谷网蚜在应对极端低温时，其体内的黑芥子酶、海藻糖、热激蛋白等都会出现显著的变化，这为新农药的开发和利用提供了新的思路。

参考文献(References)

- Bai YL. Effects of High Temperature on Two Predatory Mirid Species and the Genome Analysis of *Cyrtorhinus lividipennis* [D]. Hangzhou: Zhejiang University Doctoral Thesis, 2021. [白月亮. 高温对两种捕食性盲蝽的影响及黑肩绿盲蝽的基因组分析 [D]. 杭州: 浙江大学博士论文, 2021]
- Bale JS, Hayward S. Insect overwintering in a changing climate [J]. *J. Exp. Biol.*, 2010, 213 (6): 980.
- Behroozi E, Izadi H, Samih MA. *et al.* Physiological strategy in overwintering larvae of pistachio white leaf borer, *ocneria terebinthina* strg. (Lepidoptera: Lymantriidae) in rafsanjan, iran [J]. *Ital. J. Zool.*, 2012, 79 (1): 44-49.
- Bemani M, Izadi H, Mahdian K, *et al.* Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi* [J]. *J. Insect Physiol.*, 2012, 58 (7): 897-902.
- Bozinovic F, Bastias DA, Boher F, *et al.* The mean and variance of environmental temperature interact to determine physiological tolerance and fitness [J]. *Physiol. Biochem. Zool.*, 2011, 84 (6): 543-552.
- Cao YZ, Yin J, Li KB, *et al.* Studies on the control and reason of wheat aphids resurgence [J]. *Plant Protection*, 2006, 32 (5): 72-75. [曹雅忠, 尹姣, 李克斌, 等. 小麦蚜虫不断猖獗原因及控制对策的探讨 [J]. 植物保护, 2006, 32 (5): 72-75]
- Cheng WN, Li D, Wang Y, *et al.* Cloning of heat shock protein genes (hsp70, hsc70 and hsp90) and their expression in response to larval diapause and thermal stress in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* [J]. *J. Insect Physiol.*, 2016, 95: 66-77.
- Colinet H, Sinclair BJ, Vernon P, *et al.* Insects in fluctuating thermal environments [J]. *Annu. Rev. Entomol.*, 2015, 60: 123-140.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, *et al.* Are freezing and dehydration similar stressvectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules [J]. *Cryobiology*, 1990, 27 (3): 219-231.
- Dong YX, Pei JH, Shao YY, *et al.* Cold tolerance and cold tolerant substances of larva and adult of *Dendroctonus valens* LeConte [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (4): 978-985. [董亚新, 裴佳禾, 邵钰莹, 等. 红脂大小蠹幼虫和成虫耐寒能力及耐寒物质的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (4): 978-985]
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, *et al.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule [J]. *Glycobiology*, 2003, 13 (4): 17-27.
- Estay SA, Clavijo-Baquet S, Lima M, *et al.* Beyond average: An experimental test of temperature variability on the population dynamics

- of *Tribolium confusum* [J]. *Popul. Ecol.*, 2011, 53: 53-58.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 644-652.
- Higgins JK, Maclean HJ, Buckley LB, et al. Growth, developmental and stress responses of larvae of the clouded sulphur butterfly *Colias eriphyle* to repeated exposure to high, sub-lethal temperatures [J]. *Physiol. Entomol.*, 2015, 40 (3): 189-195.
- Huang LH, Kang L. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress [J]. *Insect Mol. Biol.*, 2007, 16 (4): 491-500.
- Jagdale GB, Grewal PS, Salminen SO. Both heat-shock and cold-shock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode [J]. *J. Parasitol.*, 2005, 91 (5): 988-994.
- Jiang X, Zhang Q, Qin YG, et al. A chromosome-level draft genome of the grain aphid *Sitobion miscanthi* [J]. *GigaScience*, 2019, 8: 1-8.
- Khanmohamadi F, Khajehali J, Izadi H. Diapause and cold hardiness of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae), two independent phenomena [J]. *J. econ. Entomol.*, 2016, 109 (4): 1646-1650.
- King AM, MacRae TH. Insect heat shock proteins during stress and diapause [J]. *Annu. Rev. Entomol.*, 2015, 60: 59-75.
- Lencioni V, Jousson O, Guella G, et al. Cold adaptive potential of chironomids overwintering in a glacial stream [J]. *Physiol. Entomol.*, 2015, 40 (1): 43-53.
- Li H, Xu XJ, Zhou SJ, et al. Analysis of differentially expressed genes in the middle pupal stage of *Apis mellifera* workers in response to low temperature stress [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65 (8): 949-957. [李寒, 徐新建, 周姝婧, 等. 西方蜜蜂工蜂蛹中期响应低温胁迫的差异表达基因分析 [J]. 昆虫学报, 2022, 65 (8): 949-957]
- Li YS, Du XH, Zhang ZX, et al. Comparative analysis of transcriptomes of male adult, pupa and the 4th-instar larva of the oriental peach moth *Grapholita molesta* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48 (6): 1320-1330. [李亦松, 杜兴辉, 张子旭, 等. 梨小食心虫雄成虫、蛹和幼虫的转录组比较分析 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (6): 1320-1330]
- Liu J, Wu KM, Zhao KJ, et al. The ecological adaptability of *Aphis gossypii* collected from different climate zones to temperature and photoperiod [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 (5): 863-869. [刘健, 吴孔明, 赵奎军, 等. 不同地理种群棉蚜对温度和光周期的生态适应性 [J]. 生态学报, 2003, 23 (5): 863-869]
- Ma J, Shen ZR, Jin XH, et al. Dispersing flight of the winged aphid *Macrosiphum (Sitobion) miscanthi* within the wheat field [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (2): 214-218. [马健, 沈佐锐, 金晓华, 等. 有翅型苜蓿谷网蚜的田间扩散飞行行为 [J]. 昆虫知识, 2008, 45 (2): 214-218]
- Meenakshi BT, Hemlata MK, Rakesh SJ. Regulation of trehalose metabolism in insects: From genes to the metabolite window [J]. *Glycobiology*, 2023, 33 (4): 262-273.
- Nieminen P, Paakkonen T, Halonen T, et al. Fatty acid modifications during autumnal cold-hardening in an obligatory ectoparasite, the deer ked (*lipoptena cervi*) [J]. *J. Insect Physiol.*, 2013, 59 (6): 631-637.
- Ouyang F, Ge F. Methodology of measuring and analyzing insect coldhardiness [J]. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 2014, 51 (6): 1646-1652. [欧阳芳, 戈峰. 昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法 [J]. 应用昆虫学报, 2014, 51 (6): 1646-1652]
- Peng YY. Identification and Functional Analysis of Glycosylhydrolase Family 1 Gene *Myr* and *Lph* in Green Peach Aphid [D]. Chongqing: Southwest University Master Thesis, 2021. [彭媛媛. 桃蚜糖基水解酶家族 1 *Myr* 与 *Lph* 的鉴定及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学硕士论文, 2021]
- Philip BN, Yi SX, Elnitsky MA. Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* [J]. *J. Exp. Biol.*, 2008, 211: 1114-1119.
- Qian YT, Zhou GH, Zhang SX, et al. Study on sexual generation of *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Plant Protection*, 1982, 1: 14-15. [钱幼亭, 周广和, 张淑香, 等. 麦长管蚜有性世代的研究 [J]. 植物保护, 1982, 1: 14-15]
- Qin J, Gao P, Zhang XX, et al. Characterization of two novel heat shock protein 70s and their transcriptional expression patterns in response to thermal stress in adult of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) [J]. *J. Integr. Agr.*, 2018, 17 (5): 1023-1031.
- Qin Z, Wang S, Wei P, et al. Molecular cloning and cold-induced expression of trehalose-6-phosphate synthase gene in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (6): 651-658. [秦资, 王魁, 魏苹, 等. 异色瓢虫海藻糖合成酶基因的克隆及低温诱导表达分析 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (6): 651-658]
- Riback JA, Katanski CD, Kear-Scott JL, et al. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response [J]. *Cell*, 2017, 168 (6): 1028-1040.
- Saeidi F, Moharrampour S, Barzegar M. Seasonal patterns of cold hardiness and cryoprotectant profiles in *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Environ. Entomol.*, 2012, 41 (6): 1638-1643.
- Sejerkilde M, Srensen JG, Loeschcke V. Effects of cold and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster* [J]. *J. Insect Physiol.*, 2003, 49 (8): 719-726.
- Shi CH, Hu JR, Li CR, et al. Research progress in the cold tolerance mechanism of insects under environmental stress [J]. *Plant Protection*, 2016, 42 (6): 21-28. [史彩华, 胡静荣, 李传仁, 等. 环境胁迫下昆虫的耐寒适应机制研究进展 [J]. 植物保护, 2016, 42 (6): 21-28]
- Sun M, Tang XT, Lu MX, et al. Cold tolerance characteristics and overwintering strategy of *Sesamia inferens* (Lepidoptera: noctuidae) [J]. *Flor. Entomol.*, 2014, 97 (4): 1544-1553.
- Wallace EWJ, Kear-Scott JL, Pilipenko EV, et al. Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress [J]. *Cell*, 2015, 162 (6): 1286-1298.
- Wang ST, Chen Y, Luo YJ, et al. Effect of three novel compounds on trehalose and chitin metabolism and development of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55 (8): 1568-1578. [王思彤, 陈艳, 罗雨嘉, 等. 三种新型化合物对草地贪夜蛾海藻糖与几丁质代谢及生长发育的影响 [J]. 中国农业科学, 2022, 55 (8): 1568-1578]
- Wang XQ, Wu YQ, Jiang Y L, et al. Analysis on chilling-tolerance of *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in winter in the wheat area of Xinxiang Country, Henan Province [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (6): 1468-1475. [王雪芹, 武予清, 蒋月丽, 等. 河南新乡小麦区苜蓿谷网蚜的冬季耐寒性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): 1468-1475]

- Xu XL, He LL, Yu XT, *et al.* Low temperature adaptability of *Sitobion miscanthi* (Hemiptera:Aphididae) and its spring source in wheat fields in Yangling, Shanxi, northwestern China [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63 (3): 309-316. [许向利, 何乐乐, 俞晓婷, 等. 麦长管蚜的低温适应性及陕西杨凌小麦田春季虫源分析 [J]. 昆虫学报, 2020, 63 (3): 309-316]
- Xu ZH, Cheng DF, Sun JR, *et al.* Resistance of wheat varieties (lines) to the different geographic populations of *Sitobion miscanthi* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (3): 729-734. [徐昭焕, 程登发, 孙京瑞, 等. 小麦品种(系)对不同地理种群获草谷网蚜的抗性 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (3): 729-734]
- Yang CX, Pan HP, Liu Y, *et al.* Selection of reference genes for expression analysis using quantitative real-time PCR in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphidiae) [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (11): e110454.
- Yuan JW, Qin J, Wei R, *et al.* Transcriptome analysis of responses of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* to high and low temperature stresses [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48 (6): 1400-1410. [袁嘉雯, 秦晶, 魏然, 等. 西花蓟马对高低温胁迫响应的转录组分析 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (6): 1400-1410]