

不同温度驯化策略诱导优雅蝨螽海藻糖合成酶基因表达及血淋巴糖类含量变化*

蹇蕾阳** 寇晓艳 董泽华 常岩林 周志军***

(河北大学生命科学学院, 河北省无脊椎动物系统学与应用重点实验室, 保定 071002)

摘要 【目的】研究模拟野外温度骤变和缓慢升降温驯化对优雅蝨螽 *Gampsocleis gratiosa* 海藻糖合成酶 (Trehalose- 6-phosphate synthase, *TPS*) 基因表达量、血淋巴海藻糖及总糖含量的影响以及三者间的相关性。【方法】通过高通量转录组数据筛选, 从优雅蝨螽中克隆 *TPS* 基因 cDNA 全长。采取模拟野外温度骤变和缓慢升降温两种温度驯化策略, 以热电偶温度计测得优雅蝨螽体温与环境温度最为接近的温度值作为最适温度, 实时荧光定量 PCR 测定优雅蝨螽 *TPS* 表达, 硫酸蒽酮法测定血淋巴海藻糖和总糖含量 (以 25℃ 最适温度作为对照)。【结果】克隆得到的 *TPS* 基因命名为 *GgTPS* (GenBank 登录号: KU578006), 全长 3 225 bp, 包含 2 430 bp 的开放阅读框, 5'-非编码区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 153 bp 和 3'-非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 642 bp。共编码 809 个氨基酸, 预测的蛋白分子量 (Mw) 91.35 ku, 理论等电点 (pI) 6.28。骤然降温阶段 *TPS* 相对表达量呈先升高后降低的变化趋势, 在 15℃ 最高, 与最适温度 25℃ 差异显著。海藻糖相对含量在 0℃ 显著高于 25℃。总糖相对含量在 0℃ 和 10℃ 显著高于 25℃。骤然升温阶段, *TPS* 相对表达量呈先降低后升高, 再降低的变化趋势, 40℃ 达到最高且与 25℃ 差异显著。缓慢降温阶段 *TPS* 相对表达量呈先升高后降低的变化趋势, 在 15℃ 和 20℃ 显著高于 25℃; 海藻糖含量表现出先降低后升高的变化趋势, 0℃ 显著高于 25℃, 总糖含量在 0℃、10℃ 和 20℃ 与 25℃ 差异显著。缓慢升温阶段 *TPS* 相对表达量先降低后升高, 30℃ 和 45℃ 显著低于 25℃。海藻糖相对含量在 40℃ 显著低于 25℃。总糖相对含量呈先升高后降低的变化趋势, 40℃ 和 45℃ 显著高于 25℃。不同温度驯化策略比较 *TPS* 相对表达量在 15℃、40℃ 差异显著; 海藻糖相对含量在 40℃ 和 45℃ 差异显著; 总糖相对含量在 10℃ 和 20℃ 差异显著; 体温在 30℃ 差异显著。【结论】温度驯化能够提高昆虫的抗逆能力, 昆虫体内 *TPS* 表达量和海藻糖合成量与其所处环境温度及作用时间密切相关。低、高温条件下 *TPS* 的表达和海藻糖的积累模式不同。

关键词 *TPS* 基因, 海藻糖, 总糖, 温度, 实时荧光定量 PCR

Effects of different temperature regimes on the expression of the trehalose-6-phosphate synthase gene and haemolymph sugar content in *Gampsocleis gratiosa*

QIAN Lei-Yang** KOU Xiao-Yan DONG Ze-Hua CHANG Yan-Lin ZHOU Zhi-Jun***

(Key Laboratory of Invertebrate Systematics and Application of Hebei Province, College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract 【Objectives】To ascertain the effects of rapid vs gradual change in temperature on trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) gene expression levels, and trehalose, and total sugar, content, in the haemolymph of *Gampsocleis gratiosa*.

【Methods】Based on the *G. gratiosa* transcriptome sequencing data set, the full cDNA of the *G. gratiosa TPS* gene was

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (31471985)

**第一作者 First author, E-mail: qianleiyanghb@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhijunzhou@163.com

收稿日期 Received: 2016-07-24, 接受日期 Accepted: 2016-11-09

cloned. Rapid and gradual change in temperature treatments were applied to *G. gratiosa*. The body temperature of *G. gratiosa* was measured with a thermocouple thermometer, and the environmental temperature closest to body temperature was regarded as the optimal temperature. *TPS* gene expression was detected using real-time fluorescent quantitative PCR. Sulfuric acid-anthrone colorimetry was used to measure trehalose, and total sugar, content (the control was the normal content at 25°C). **[Results]** The cDNA was cloned and designated as *GgTPS* (GenBank accession no. KU578006). The full-length cDNA of *GgTPS* is 3 225 bp with 5'- and 3'-untranslated regions of 153 bp and 642 bp, respectively. It contains an open reading frame of 2 430 nucleotides encoding a protein of 809 amino acids residues with a predicted molecular mass of approximately 91.35 ku and isoelectric point of 6.28. *TPS* expression levels first increased, then decreased, peaking at 15°C, which was in marked contrast to that measured at 25°C during the rapid cooling phase. Trehalose content remained constant level before increasing to a high level at 0°C. Total sugar content increased gradually, reaching a maximal level at 0°C. During the rapid heating stage, *TPS* had a down-up-down expression profile, peaking at 40°C. During the gradual cooling stage, *TPS* expression first increased, then decreased, and was highly expressed at 15°C and 20°C. Trehalose content first decreased, then increased, and was significantly higher at 0°C. Total sugar content was markedly different at 0°C, 10°C and 20°C to that measured at 25°C. During gradual heating, *TPS* expression first declined, then increased, and was significantly lower at 30°C and 45°C. Trehalose content was significantly lower at 40°C than at 25°C. Total sugar content first increased, then declined, and was significantly higher at 40°C and 45°C than at 25°C. Comparing rapid vs gradual change in temperature, *TPS* expression differed significantly at 15°C and 40°C, and trehalose content was markedly different at 40°C and 45°C. Total sugar content was markedly different at 10°C and 20°C, and body temperature was also markedly different at 30°C. **[Conclusion]** Temperature acclimatization improves the ability of insects to resist stress. The *TPS* expression levels and trehalose content of insects are closely related to ambient temperature, as well as the duration of temperature acclimatization. Patterns of *TPS* expression and trehalose accumulation in *G. gratiosa* kept at low temperature differ from those at high temperature.

Key words *TPS* gene, trehalose, total sugar, temperature, real-time fluorescent quantitative PCR

海藻糖广泛存在于脊椎动物以外(Kern *et al.*, 2012; Arguelles, 2014), 包括原生生物、细菌、真菌、植物和无脊椎动物等各个生物类群, 其主要作为机体组织间相容性溶质, 压力保护剂, 转运糖, 储备性碳水化合物, 应激代谢产物或直接能量来源(于彩虹等, 2008; Arguelles, 2014; Delorge *et al.*, 2015)。在昆虫纲中, 海藻糖有“生命之糖”的美誉, 1858年 Berthelot 最早在象鼻虫 *Larinus nidificans* 中发现, 并正式命名为海藻糖(Becker *et al.*, 1996; 于彩虹等, 2008)。昆虫血淋巴中海藻糖浓度超过哺乳动物血液中的葡萄糖, 对多数昆虫而言海藻糖缺乏通常意味着生命或死亡(于彩虹等, 2008)。在高温、寒冷、干燥、缺氧和营养匮乏等恶劣环境胁迫下, 昆虫主要通过脂肪体合成海藻糖, 并释放到血淋巴和其它组织中作为冷冻保护剂有效地稳定脱水酶(Khani *et al.*, 2007), 保护生物膜和蛋白(Wiemken, 1990; Eleutherio *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2015), 在压力环境解除后作为分子伴侣促进蛋

白重折叠(Singer and Lindquist, 1998)。此外, 昆虫血淋巴中海藻糖浓度变化对于调控碳水化合物的摄取及体内营养动态平衡具有重要意义(于彩虹等, 2008)。

海藻糖是两个吡喃型葡萄糖单体以 $\alpha 1-\alpha 1$ 糖苷键连接形成的非还原性二糖(Cui and Xia, 2009; Iturriaga *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2012), 两个己糖环间低能量的糖苷键使海藻糖比与其结构相似的糖类更稳定(Iturriaga *et al.*, 2009; Arguelles, 2014)。生物体内海藻糖的合成通路最早在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中被阐明(Kern *et al.*, 2012)。目前, 已报道 5 条海藻糖合成通路, 分别是以葡萄糖为底物的海藻糖-6-磷酸合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase, *TPS*)/海藻糖-6-磷酸脂酶(Trehalose-6-phosphate phosphatase, *TPP*)通路、TreY/TreZ(Maltooligosyl trehalose synthase/maltooligosyl trehalose trehalohydrolase)通路、以麦芽糖为底物的 TreS(Trehalose synthase)通路、以 ADP-葡萄糖为底物 TreP

(Trehalose phosphorylase) 通路和 TreT (Trehaloseglycosyl transferring synthase) 通路 (唐斌等, 2014; 秦加敏等, 2015)。研究最透彻和存在最广泛的是 TPS/TPP 途径 (唐斌等, 2014), 即 TPS 催化 α -葡萄糖从尿苷二磷酸 (Uridine diphosphate, UDP)-葡萄糖转移到 6-磷酸葡萄糖生成 6-磷酸海藻糖 (Trehalose-6-phosphate, Tre6P) 和 UDP, 之后在 TPP 作用下, Tre6P 转变为海藻糖 (Cui and Xia, 2009; Kern et al., 2012)。海藻糖的生物合成在昆虫生理平衡、发育调控、卵子发生 (Santos et al., 2012)、运动和能量代谢等方面有重要作用 (Tang et al., 2010, 2014)。TPS 是调控海藻糖合成的关键基因, 其差异表达能够影响血淋巴中海藻糖水平 (Chen et al., 2010), 除参与海藻糖合成外, 还是昆虫生长发育的重要酶 (Tang et al., 2010)。Chen 等 (2002) 研究表明 TPS 基因突变导致黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 早期幼虫死亡。昆虫体内海藻糖的分解代谢则依赖海藻糖酶 (Trehalase, TRE) 将组织和细胞中的海藻糖水解为两分子葡萄糖 (Iturriaga et al., 2009; Guo et al., 2015)。一些研究发现在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (EU878265) (Xu et al., 2008)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (EF051258) (Tang et al., 2010)、葱蝇 *Delia antiqua* (AFW99833) (Guo et al., 2015)、异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (FJ501960) (秦资等, 2012)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (EU131894) (Cui and Xia, 2009) 和红褐斑腿蝗 *Catantops pinguis* (GQ389790) (Tang et al., 2011) 中的 TPS 氨基酸序列同时具有 TPS 和 TPP 两个保守的功能域: 其 N-端 TPS 域与大肠杆菌 OstA 相同, C-端 TPP 域则与大肠杆菌 OstB 相同 (李源等, 2013); 而在棉铃虫 *H. armigera* (DQ086235) 和甜菜夜蛾 *S. exigua* (FJ792706) 中同时存在仅包含 TPS 保守序列的 TPS 基因 (Tang et al., 2014), 在黑腹果蝇 *D. melanogaster* (BT100029)、桑粉介壳虫 *Maconellicoccus hirsutus* (EF092085)、嗜眠摇蚊 *Polypedilum vanderplanki* (AB490334) (Mitsumasa et al., 2010)、致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus*

(XM_001850944)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (XM_001660971)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (XM_317247) 和葱蝇 *D. antiqua* (KJ130467) (Guo et al., 2015) 也存在单独的 TPP 基因 (Tang et al., 2010)。

昆虫血淋巴中的总糖包括还原性的葡萄糖、蔗糖、果糖、戊糖、麦芽糖、淀粉等。这些物质能够缓解昆虫细胞渗透压, 调节细胞自由水含量, 增加束缚水的含量, 或直接与酶及其他的蛋白质相互作用增强昆虫耐寒性 (Kostal et al., 2001; 黄娜娜等, 2015)。

国内外关于影响昆虫 TPS 基因表达和海藻糖含量的研究有很多。Chen 等 (2002) 最早在黑腹果蝇 *D. melanogaster* 中克隆获得 TPS1 基因, 过表达实验证明转 TPS1 基因的果蝇具有更高的缺氧耐受能力。Cui 和 Xia (2009) 克隆获得了东亚飞蝗 *L. migratoria manilensis* LmTPS 基因 cDNA 全长, 半定量分析表明 LmTPS 主要表达于脂肪体, 此外, 在肠道、血淋巴和肌肉组织中也有少量表达。Kern 等 (2012) 克隆了猫栉头蚤 *Ctenocephalides felis* 的 CfTPS 基因, 通过大肠杆菌异源表达获得了有活性的海藻糖合成酶, 并确定葡萄糖-6-磷酸和 UDP-葡萄糖作为底物时, 该酶的米氏常数。秦资等 (2012) 对异色瓢虫 *H. axyridis* 的 HaTPS 基因进行了克隆, 实时荧光定量表明 HaTPS 在预蛹期表达量最高, 且升、降温处理条件下, HaTPS 表达量随温度变化而变化。Tang 等 (2010) 将 5 mg dsSeTPS 注射于 5 龄 2 d 甜菜夜蛾 *S. exigua* 幼虫胸腔, 结果表明幼虫存活率显著低于对照组。李源等 (2013) 克隆了葱蝇 *D. antique* DaTPS1 基因, 实时荧光定量分析表明 DaTPS1 在夏滞育和冬滞育前、后期表达量较高, 而滞育保持期和非滞育期表达量较低。Matsuda 等 (2015) 以黑腹果蝇 *D. melanogaster* 为材料, 将转座 P 元件插入个体 ($P\{lacWk\}08903$) 与对照体 (W^+) 回交获得 Tps1 突变体, 分别通过饲喂低糖和低蛋白食物证明了海藻糖在果蝇发育期间起关键作用。Yang 等 (2016) 通过 RNAi 下调褐飞虱 *Nilaparvata*

lugens 的 *NLTPS1* 和 *NLTPS2* 基因, 结果导致几丁质酶基因表达显著下降, 蜕皮畸形, 死亡率增加。

优雅蝈蝈 *Gampsocleis gratiosa* (Brunner von Wattenwyl) 隶属于直翅目 Orthoptera 螽斯科 Tettigoniidae, 其雄性成虫鸣声优美, 作为鸣虫在我国具有上千年的饲养历史。在野外, 由于 9 月下旬或 10 月上旬温度骤降而大量死亡, 而在人工饲养情况下, 则可存活至 12 月份。为探究不同温度驯化模式下, 温度对优雅蝈蝈 *TPS* 基因表达的影响。本研究通过对 2 代高通量测序获得的优雅蝈蝈转录组数据进行搜索获得了 *TPS* 基因片段, 并在此基础上克隆获得了 *TPS* 的 cDNA 序列全长, 进而模拟野外温度骤变和缓慢升降温驯化对优雅蝈蝈 *TPS* 基因表达量、血淋巴海藻糖及总糖含量的影响以及三者间的相关性。为 *TPS* 和海藻糖在提高昆虫抗逆能力方面的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

优雅蝈蝈采自河北保定顺平大岭后(115.07°E, 38.93°N), 置于实验室 RXZ 智能型人工气候箱(宁波江南仪器厂) 25℃ 饲养。

1.2 *TPS* 基因 cDNA 全长克隆

于无菌环境下, 沿优雅蝈蝈腹部侧线剪开摘取脂肪体置于 1.5 mL RNase-free 冻存管中, 以 RNAiso Plus (TaKaRa 公司) 法提取总 RNA, 并溶于 30 μL RNase-free 超纯水。使用超微量分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度和完整性。取约 1 μg 总 RNA, 按照 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis 和 PrimeScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa 公司) 操作说明进行反转录。

基于优雅蝈蝈转录组数据筛选所得的 *TPS* 基因片段(3 030 bp), 使用 MPprimer 共设计 3 对中间段扩增引物(TAF/TAR, TBF/TBR, TCF/TCR)和 4 条 RACE 引物(T5R1, T5R2, T3F1, T3F2)(表 1), 以反转录所得 cDNA 为模板, 进行中间段 PCR、5'-和 3'-末端 RACE 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, 连接至

pMD-19T 载体, 挑取 3 个阳性克隆进行测序。

1.3 不同温度驯化策略对优雅蝈蝈体温、血淋巴糖含量与 *TPS* 基因表达的影响

选取发育状况良好的优雅蝈蝈雄性成虫 80 只, 于 0~45℃ 之间, 间隔 5℃ 设置驯化温度梯度, 各处理温度 4 个生物学重复。两种温度驯化策略分别为: (1) 模拟野外温度骤变, 将试虫直接置于设定好处理温度的人工气候箱中饲养 48 h; (2) 缓慢升降温驯化, 试虫首先置于 25℃ 动物昆虫行为习性观察分析系统(北京卡索众合科技有限公司) 中, 按照 2.5℃/24 h 升降温速率逐渐达到设定处理温度, 并持续饲养 48 h, 期间自由取食。

试虫取出后, 首先, 用热电偶温度计(Harvard Apparatus No.630188) 测定不同处理温度下优雅蝈蝈体腔温度; 然后, 用无菌眼科手术剪于试虫后足基部剪断, 取 20 μL 血淋巴溶于 100 μL 含苯基硫脲晶体和柠檬酸盐的生理盐水中, 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min, 取 100 μL 上清液加入 700 μL 超纯水, 充分混匀并依次、缓慢加入 100 μL 0.66 mol/L 的硫酸溶液和 100 μL 10% 钨酸钠溶液。充分混匀并静置 10 min, 1 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀, 制备无蛋白血淋巴溶液, 硫酸蒽酮法测定总糖和海藻糖含量(曹传旺和高彩球, 2009)。

以 18S rRNA 作为内参, 对 *TPS* 基因表达进行实时荧光定量 PCR 测定, 目的基因和内参基因引物见表 1。不同温度驯化处理试虫总 RNA 提取及反转录同 1.2。取 4 μL 反转录所得 cDNA 为模板, 上、下游引物各 0.5 μL, SYBR Green 5 μL, 在荧光定量 PCR 仪(LightCycle[®] 96 Instrument) 进行反应。

1.4 生物信息学分析与数据统计

使用 ORF Finder 在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行开放阅读框及基因两端非编码区预测并推导出相应的氨基酸序列。ProtParam 在线(<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白分子量和理论等电点。TMHMM Server 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 SignalP 4.1 在线软件

表 1 优雅蝟蠹 *TPS* 基因克隆及表达定量所用引物
Table 1 The primer used in *Gampsocleis gratiosa* *TPS* cloning and quantitative analysis

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	引物用途 Primer usage
TAF	TCCCAACGATCAGACCCCTACTGC	中间段 Intermediate fragment
TAR	GCCTTTAACCTGTGTACAAGGCCC	
TBF	TGGTTCTTGGTGTGGATCGTCTGG	
TBR	GCGCCAATTTGTGAGTAGTGCCA	
TCF	ACCCACCACAATGCAACCTGTCA	
TCR	CGCCGATTCATGTGACGTTCAACC	5'-RACE
T5R1	TGCTGAAAACACTGCTCTGTCTGGC	
T5R2	TGCAGTAGGGGTCTGATCGTTGGG	
T3F1	AAGGCTGGAGATGCTCACTGCG	
T3F2	GCTGAACGTCGGCTGCCAAGTA	
TPSF	TCTGCAAGGAAGGTGCCTGGGT	实时荧光定量 PCR Real-time fluorescent quantitative PCR
TPSR	CACTGAACGGGTGGCTTGGCTT	
18SrRNAF	TGCATGGCCGTTCTTAGTTGG	内参引物 Internal reference primer
18SrRNAR	TGTGTTGTCGCCGGTAGCAC	

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分别对 *TPS* 跨膜结构域和信号肽进行预测。SMART 在线 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域。NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测潜在的 N-糖基化位点。*TPS* 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。海藻糖和总糖相对含量以 25℃ 所测吸光值为标准归一化。用 SPSS 19.0 处理实验数据, 获得平均值和标准误。同种驯化方式不同温度的 *TPS* 相对表达量、海藻糖和总糖相对含量采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan's 多重比较。相同温度不同驯化方式, 先以温度为分组方式拆分文件, 再采用独立样本 *t*-检验分析。

2 结果与分析

2.1 优雅蝟蠹 *TPS* 基因 cDNA 全长克隆及分析

以优雅蝟蠹脂肪体提取的总 RNA 反转录所得 cDNA 为模板, 利用中间段扩增引物 TAF/TAR, TBF/TBR, TCF/TCR 获得 *TPS* 基因 cDNA 序列中间 A、B、C 3 段长度分别为 711、711、819 bp。利用 RACE 引物 T5R1、T5R2、T3F1 和 T3F2 得到 *TPS* 基因 cDNA 序列 5'-和 3'-末端长度分别为

404 bp 和 853 bp (图 1)。测序结果经拼接获得 *TPS* 基因 cDNA 全长 3 225 bp, 并命名为 *GgTPS* (GenBank 登录号: KU578006), 包括 1 个 2 430 bp 的开放阅读框, 共编码 809 个氨基酸 (图 2), 5'-非编码区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 和 3'-非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 长度分别为 153 bp 和 642 bp。氨基酸序列的第 107, 547 和 558 位残基分别为 3 个潜在的 N-糖基化位点。生物信息学预测蛋白分子量 (*M_w*) 为 91.35 ku, 理论等电点 (*pI*) 为 6.28。蛋白质结构域分析结果表明: 不存在跨膜结构域和信号肽, *GgTPS* 氨基酸序列含 TPS (8-487 位氨基酸, *E*=2.5e-133) 和 TPP (526-751 位氨基酸, *E*=7e-35) 两个保守功能区 (图 2)。将预测的优雅蝟蠹 *GgTPS* 氨基酸序列在 NCBI 进行同源性搜索发现: 与同属直翅目的红褐斑腿蝗 *C. pinguis* 和东亚飞蝗 *L. migratoria manilensis* 相似性最高, 分别达到 99% 和 96%。

2.2 不同处理方式对优雅蝟蠹 *TPS* 表达、血淋巴海藻糖和总糖含量的影响

2.2.1 模拟野外温度骤变处理 以 25℃ 正常饲养温度作为对照, 模拟野外温度骤变处理组中,

A. Intermediate fragment A ; B. Intermediate fragment B ; C. Intermediate fragment C ; D. 5'-terminal ; E. 3'-terminal.



脂肪体 *TPS* 表达量及血淋巴中海藻糖和总糖相对含量变化分别如图 3。在降温阶段, *TPS* 相对表达量先升后降, 15℃ 和 20℃ 显著高于 25℃ 相对表达量, 其中, 15℃ 最高为对照组 6.56 倍; 升温阶段, *TPS* 相对表达量先降后升, 最后再降低, 其中, 40℃ 显著高于 25℃ 相对含量, 是 25℃ 的 2.48 倍, 35℃ 和 45℃ 均显著低于 25℃, 分别是 25℃ 的 0.50 倍和 0.22 倍; 其它温度则与 25℃ 对照组无显著差异。血淋巴中海藻糖相对含量在 0℃ 与 25℃ 差异显著, 为 25℃ 对照组 1.39 倍; 45℃ 最低, 与 25℃ 差异显著; 其它温度则与 25℃ 差异不显著。总糖在 0、10、40、45℃ 均显著高于 25℃, 其它温度则与 25℃ 对照组无显著差异。

2.2.2 缓慢升降温驯化处理 缓慢升降温处理组的 *TPS* 表达量及海藻糖和总糖相对含量变化如图 4。降温阶段, *TPS* 相对表达量先升后降, 其中, 15℃ 和 20℃ 均显著高于 25℃, 20℃ 表达量最高, 为 25℃ 的 3.27 倍; 升温阶段, *TPS* 相对表达量先降后升并趋于稳定, 30℃ 表达量最低, 仅为 25℃ 的 0.15 倍; 其它温度则与 25℃ 无显著差异。血淋巴中海藻糖相对含量, 在降温阶段先降后升, 其中, 15℃ 最低, 而 0℃ 最高, 分别为 25℃ 的 2.16 倍和 0.66 倍, 且均与 25℃ 差异

显著; 升温阶段仅 40℃ 显著低于 25℃, 其它温度则与 25℃ 对照组无显著差异。总糖相对含量在 0、10、20、40、45℃ 均显著高于 25℃, 其中以 10℃ 最高, 为 25℃ 的 2.95 倍, 其它温度则与 25℃ 对照组无显著差异。

2.2.3 两种处理方式的比较 两种不同温度驯化模式下, 优雅蝨蠹脂肪体中 *TPS* 相对表达量比较如图 5 (A)。在 15℃ 和 40℃, 模拟野外温度骤变处理的 *TPS* 相对表达量显著高于缓慢升降温处理组 (分别为 2.66 倍和 4.67 倍), 而在其它温度则无显著差异。血淋巴中海藻糖相对含量比较如图 5 (B) 所示, 40℃ 下模拟野外温度骤变处理组显著高于缓慢升降温处理组 (1.38 倍), 45℃ 缓慢升温处理组显著高于骤然变温处理组 (1.76 倍) 而在其它温度则无显著差异。血淋巴中总糖相对含量比较如图 5 (C) 所示, 10℃ 和 20℃ 下缓慢升降温处理组显著高于模拟野外温度骤变处理组 (分别为 1.15 倍和 1.39 倍), 其中, 20℃ 差异极显著, 而其它温度则无显著差异。优雅蝨蠹体温变化如图 5 (D) 所示, 在 30℃ 模拟野外温度骤变处理组显著高于缓慢升降温处理组 (1.03 倍), 而其它温度无显著差异。

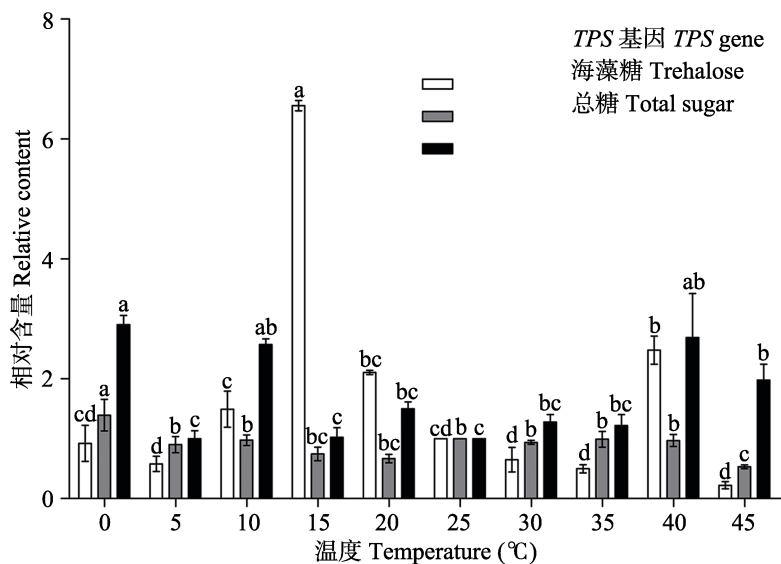


图 3 优雅蝨蠹温度骤变驯化相关指标分析

Fig. 3 The analysis of relevant indices of *Gampsocleis gratiosa* under the temperature rapid change domestication strategy

柱上标有不同字母代表在 0.05 水平差异显著 (Duncan's 多重比较检验)。以 25℃ 作为对照组 (CK)。下图同。

Histograms with different letters indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

25℃ is used as control check (CK). The same below.

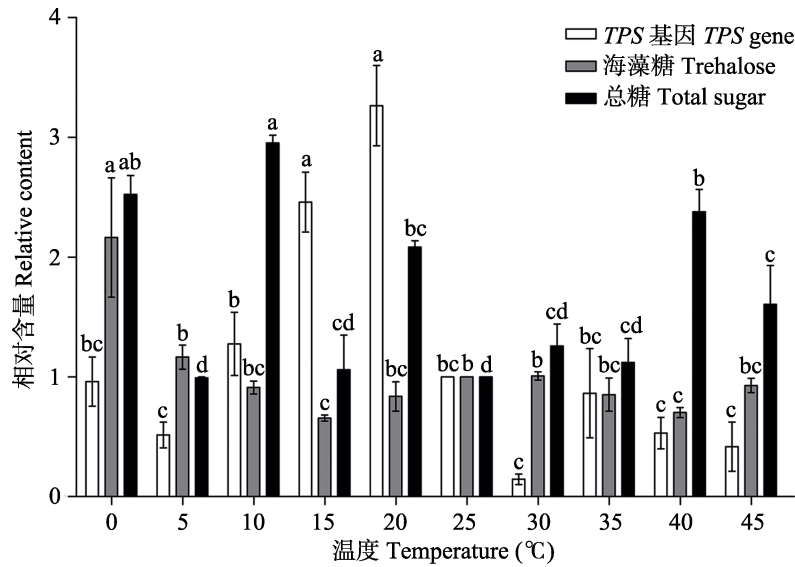


图 4 优雅蛭螽缓慢升降温驯化相关指标分析

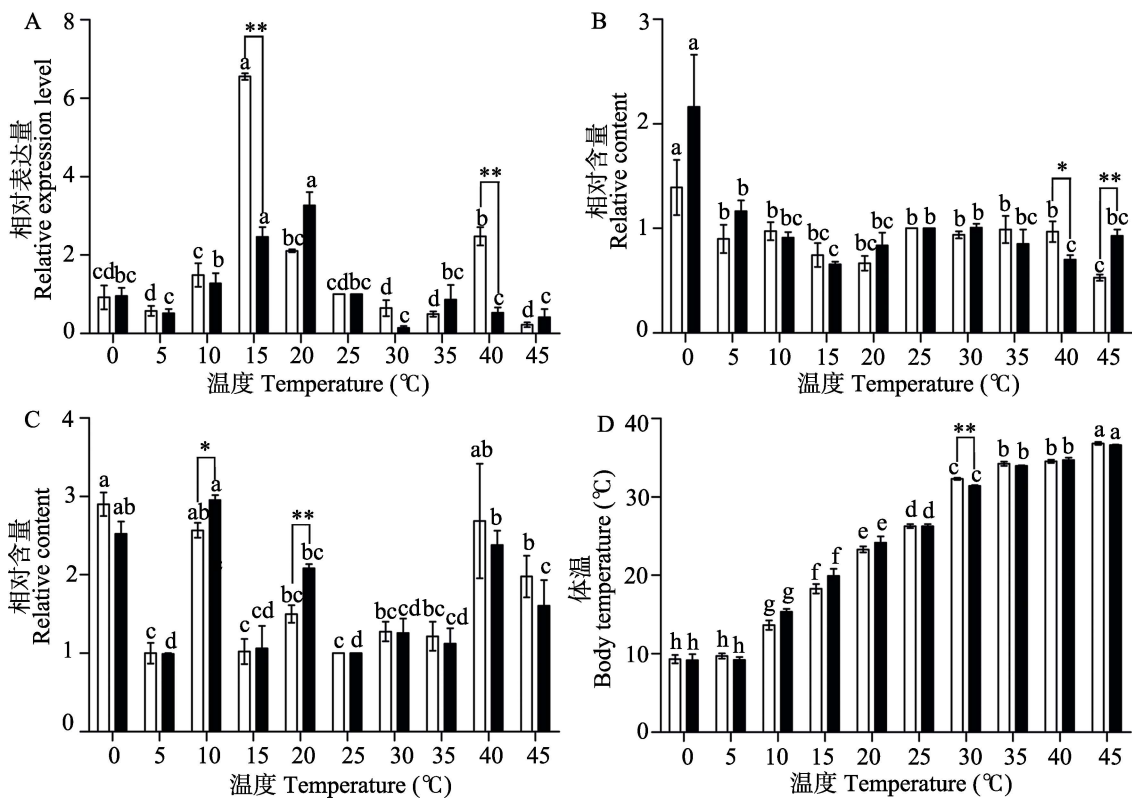
Fig. 4 The analysis of relevant indices of *Gampsocleis gratiosa* under the temperature gradual change domestication strategy

图 5 优雅蛭螽不同温度驯化策略相关指标比较

Fig. 5 The comparison of relevant indices of *Gampsocleis gratiosa* during different temperature domestication strategy

A. TPS 相对表达量; B. 海藻糖相对含量; C. 总糖相对含量; D. 体温。灰色和黑色分别代表温度骤变和缓慢升降温驯化策略。* 和**分别代表独立样本 t -检验差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极其显著 ($P < 0.01$)。

A. TPS relative expression level; B. Trehalose relative content; C. Total sugar relative content; D. Body temperature. Gray and black represent the temperature rapid and gradual change domestication strategy, respectively. * and ** indicates significant differences at 0.05 level, and extremely significant differences at 0.01 level by independent-samples t -test, respectively.

3 讨论

本研究克隆得到优雅蝨蠹的 *TPS* 基因 cDNA 全长为 3 225 bp, 编码 809 个氨基酸, BLAST 序列同源性搜索发现和其它已报道昆虫的 *TPS* 氨基酸序列高度相似, 其中, 以同属直翅目的红褐斑腿蝗 *C. pinguis* 和东亚飞蝗 *L. migratoria manilensis* 相似性最高, 分别达到 99% 和 96%。预测的氨基酸含 3 个潜在的 N-糖基化位点, 分别位于第 107、547 和 558 位氨基酸残基。预测其结构域发现 N-端的 *TPS* 域与大肠杆菌 *OstA* 相同, C-端的 *TPP* 域与大肠杆菌 *OstB* 相同, 因此该 cDNA 编码 *TPS* (Cui and Xia, 2009), 进一步证明昆虫的 *TPS* 是融合基因的观点 (Guo *et al.*, 2015), 推测部分昆虫体内的 *TPS* 基因具有不同的剪接功能, 可同时行使 *TPS* 和 *TPP* 的功能参与海藻糖的合成 (唐斌等, 2014)。

关于温度驯化时间的长短, 不同研究变化较大。秦资等 (2012) 报道异色瓢虫 *H. axyridis* 经不同温度冷驯化 1 h, *HaTPS* 表达量显著变化。Shi 等 (2016) 表明将异色瓢虫 *H. axyridis* 低温驯化 2 h, 海藻糖和糖原含量与对照组差异显著。段小凤等 (2015) 研究发现与快速冷驯化 (2 h) 相比, 长时间冷驯化 (24 h、48 h) 除了未能显著提高茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 蛋白质含量外, 二者均可引起虫体内脂肪、糖原含量明显增加, 过冷点和结冰点降低, 从而显著提高其耐寒性。Chen 等 (1990) 表明与短时间冷驯化相比, 长时间冷驯化能更好地保护红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 免受冷休克伤害。本研究选择 48 h 作为不同温度驯化时间, 显著影响优雅蝨蠹 *TPS* 表达量、血淋巴海藻糖和总糖含量, 而快速驯化是否可以增强优雅蝨蠹抗逆性则有待进一步研究。

不同温度驯化策略相比, 缓慢变温处理组 *TPS* 相对表达量在 15℃ 和 40℃ 显著低于模拟野外骤然变温处理组, 推测缓慢温度驯化至 15℃ 和 40℃, 优雅蝨蠹体内积累的海藻糖已经满足其需要, 故不需利用资源再合成 (秦资等, 2012)。缓慢变温处理组 45℃ 海藻糖相对含量显著高于

模拟野外骤然变温处理组, 总糖相对含量在 10℃ 和 20℃ 显著高于骤然变温处理组。鉴于糖类在逆境中对自由水含量的调节以及对蛋白和生物膜的保护作用 (Kostal *et al.*, 2001; 黄娜娜等, 2015), 推测缓慢变温驯化更有利于提高昆虫的抗逆能力。但模拟野外骤然变温处理组海藻糖含量在 40℃ 显著高于缓慢变温处理组, 推测经 40℃ 骤然高温处理, *TPS* 表达量升高促进海藻糖的合成量增加, 暗示 *TPS* 在海藻糖合成过程中起重要作用 (Iturriaga *et al.*, 2009)。进一步证明节肢动物中 *TPS* 表达量增加与海藻糖含量直接相关 (Shi and Chung, 2014)。

温度改变时, 多细胞生物体会通过改变基因表达做出反应 (Qin *et al.*, 2005)。降温驯化阶段, 两种驯化策略 *TPS* 相对表达量均先升后降, 在 15℃ 和 20℃ 显著高于对照组, 其它温度与对照组无显著差异。推测低温冷驯化的生理反应可能受某些酶和基因的调控, 这些酶和基因只有在某一温度范围内才会被激活起作用 (Fujiwara and Denlinger, 2007; 李兴鹏等, 2012)。秦资等 (2012) 研究发现将异色瓢虫 *H. axyridis* 直接置于 15℃ 处理 1 h, *TPS* 相对表达量显著高于 25℃ 对照组, 与本研究结果一致。然而, 秦资等 (2012) 将异色瓢虫 *H. axyridis* 分别直接置于 0℃ 和 5℃ 处理 1 h, 以及陈静和张道伟 (2015) 将德国小蠊 *Blattella germanica* 直接置于 0℃ 处理 1 h *TPS* 相对表达量均显著高于其在 25℃ 正常表达水平的结果与本研究不同。这可能是因为昆虫 *TPS* 表达对长期低温刺激和短时低温刺激有不同的反应机制, 也可能低温刺激对基因表达的影响具有物种间差异性 (岳雷等, 2014)。冷驯化能够提高昆虫的抗冻能力 (Kelty and Lee, 2001; Terblanche *et al.*, 2007), 而海藻糖在低温冷冻环境下对生物膜和蛋白有重要保护作用 (Wiemken, 1990; Eleutherio *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2015)。两种驯化策略 0℃ 海藻糖含量均显著升高, Shi 等 (2016) 的研究表明异色瓢虫 *H. axyridis* 经 0℃ 驯化 2 h 海藻糖含量显著增加, 与本研究结果一致。推测经长时间低温诱导, *TPS* 的调控能力加强, 相同的 *TPS* 可以合成更多的海藻糖 (秦资等,

2012),进一步证明冷驯化能够提高昆虫的抗冻能力。而此时海藻糖积累或许和降低过冷却点,防止结冰脱水相关(Khani *et al.*, 2007; Sinclair *et al.*, 2007),说明低温逆境下海藻糖有保护优雅蝨螽的作用(Shi *et al.*, 2016)。与TPS相对表达量变化趋势不同,15℃和20℃海藻糖含量并无显著增加,这可能涉及到其它的调控模式(Shi *et al.*, 2016)。或许TPS属于限速酶,此阶段优雅蝨螽体内海藻糖含量抑制海藻糖进一步合成(Murphy and Wyatt, 1964),也可能该温度下海藻糖合成、分解平衡,故积累量无显著变化(Matsuda *et al.*, 2015)。缓慢降温处理组海藻糖含量在15℃显著低于对照组,推测该温度下TRE活性增强,大量海藻糖被用于分解提供能量。这或许反应出在对昆虫的保护方面,海藻糖代谢的精确调控比海藻糖的含量更重要(Matsuda *et al.*, 2015)。总糖含量变化可能是碳水化合物向脂肪酸氧化或多元醇转换(Kostal *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2005),有报道认为糖类和多元醇周期性发生与它们的最大抗冻能力紧密相关,多元醇周期性积累是越冬昆虫冷驯化的重要方面,生物膜的磷脂质也有周期性调整的现象(Kostal *et al.*, 2001)。也可能糖类的合成速率以及糖类由脂肪体向血淋巴的转运速率在不同温度下有差异(Kostal *et al.*, 2001)。

模拟野外环境温度骤然升高处理组,TPS相对表达量先下降后上升再下降,在40℃显著高于25℃正常表达水平,Michaud等(1997)、Sinclair等(2007)报道黑腹果蝇*D. melanogaster*的Hsp23和Hsp70在高温条件下也会表现出上调趋势,而缓慢升温驯化组TPS相对表达量在30℃和45℃显著下调。模拟野外骤然升温处理组海藻糖含量在45℃显著下降,缓慢升温处理组在40℃显著下降,Guo等(2015)报道高温条件下,葱蝇*D. antique*体内海藻糖不积累与本研究结果一致。可能高温条件下TRE活性要高于TPS(Guo *et al.*, 2015),优雅蝨螽分解代谢更多海藻糖提供能量。另外,两种不同驯化策略总糖在40℃和45℃显著升高,这或许与防蒸发脱水相关(Sinclair *et al.*, 2007)。TPS相对表达量与低

温驯化的差异可能是因为冷热刺激下TPS的表达模式不同(Sinclair *et al.*, 2007),海藻糖在低温休眠积累而在高温沉默时不积累的现象或许反应出昆虫冬、夏季休眠的本质不同(Guo *et al.*, 2015)。另外,前期实验观察45℃高温时,骤然升温处理组的优雅蝨螽比缓慢升温处理组过早进入热昏迷状态,或许证明缓慢热驯化更有益于提高优雅蝨螽抗逆能力。

昆虫属于变温动物,体温随环境温度变化而改变(马国兰等, 2015)。昆虫体温变化一般遵循两种规律,即行为性调节体温和非行为性调节体温。行为性调节体温表现为体温与环境温度非线性变化,而非行为性体温调节表现为体温趋近环境温度,与环境温度呈线性关系(岳梅等, 2009)。本研究温度驯化过程,优雅蝨螽体温随环境温度非线性变化,因此优雅蝨螽的体温变化属于行为性调节规律。推测血淋巴积累的糖类和醇类物质,在临界高、低温条件下提高体温调节能力。

根据本文研究结果,温度驯化能够提高昆虫的抗逆能力,昆虫体内TPS表达量和海藻糖合成量与其所处环境温度及作用时间密切相关。低、高温条件下TPS的表达和海藻糖的积累模式不同。本研究为TPS和海藻糖提高昆虫抗逆能力的研究奠定基础,同时为发现防治害虫新靶标,保护农业提供理论依据。

参考文献 (References)

- Arguelles JC, 2014. Why can't vertebrates synthesize trehalose. *Journal of Molecular Evolution*, 79(3/4): 111–116.
- Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5): 433–439.
- Cao CW, Gao CQ, 2009. The Experimental Technique of Insect Biochemistry and Molecular Biology. Haerbin: Northeast Forestry University Press. 16–18. [曹传旺, 高彩球, 2009. 昆虫生化与分子生物学实验技术. 哈尔滨: 东北林业大学出版社. 16–18.]
- Chen CP, Jr Lee RE, Denlinger DL, 1990. A comparison of the responses of tropical and temperate flies (Diptera: Sarcophagidae) to cold and heat stress. *Journal of Comparative Physiology B*, 160(5): 543–547.

- Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Chen J, Zhang W, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 777–786.
- Chen J, Zhang DW, 2015. Molecular cloning, tissue distribution and temperature-induced expression of two trehalose-6-phosphate synthase genes in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1046–1053. [陈静, 张道伟, 2015. 德国小蠊两个海藻糖合成酶基因的克隆、组织分布及温度诱导表达分析. 昆虫学报, 58(10): 1046–1053.]
- Chen Q, Ma E, Behar KL, Xu T, Haddad GG, 2002. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5): 3274–3279.
- Cui SY, Xia YX, 2009. Isolation and characterization of the trehalose-6-phosphate synthase gene from *Locusta migratoria manilensis*. *Insect Science*, 16(4): 287–295.
- Delorge I, Figueroa CM, Feil R, Lunn JE, Van Dijck P, 2015. Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 466(2): 283–290.
- Duan XF, Wang XQ, Li PW, Tian JT, Peng P, Chen SC, 2015. Effects of cold hardening on physiological indices related to cold tolerance in *Ectropis obliqua* pupae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1413–1420. [段小凤, 王晓庆, 李品武, 田景涛, 彭萍, 陈世春, 2015. 冷驯化对茶尺蠖抗寒性生理指标的影响. 应用昆虫学报, 52(6): 1413–1420.]
- Eleutherio ECA, de Araujo PS, Panek AD, 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156(3): 263–266.
- Fujiwara Y, Denlinger DL, 2007. p38 MAPK is a likely component of the signal transduction pathway triggering rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Experimental Biology*, 210(18): 3295–3300.
- Guo Q, Hao YJ, Li Y, Zhang YJ, Ren S, Si FL, Chen B, 2015. Gene cloning, characterization and expression and enzymatic activities related to trehalose metabolism during diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Gene*, 565(1): 106–115.
- Huang NN, Dai P, Fu YG, Jin T, Huang QY, 2015. Measurement of physiological indices of cold tolerance in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(3): 694–701. [黄娜娜, 代鹏, 符悦冠, 金涛, 黄求应, 2015. 瓜实蝇耐低温相关生理指标的测定. 应用昆虫学报, 52(3): 694–701.]
- Iturriaga G, Suarez R, Nova-Franco B, 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9): 3793–3810.
- Kelty JD, Lee RE, 2001. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically. *Journal of Experimental Biology*, 204(9): 1659–1666.
- Kern C, Wolf C, Bender F, Berger M, Noack S, Schmalz S, Ilg T, 2012. Trehalose-6-phosphate synthase from the cat flea *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster*: gene identification, cloning, heterologous functional expression and identification of inhibitors by high throughput screening. *Insect Molecular Biology*, 21(4): 456–471.
- Khani A, Moharramipour S, Barzegar M, 2007. Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *European Journal of Entomology*, 104(3): 385–392.
- Kostal V, Slachta M, Simek P, 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130(3): 365–374.
- Li XP, Song LW, Zhang HH, Chen YQ, Zuo TT, Wang J, Sun W, 2012. Responses of *Arma chinensis* cold tolerance to rapid cold hardening and underlying physiological mechanisms. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 23(3): 791–797. [李兴鹏, 宋丽文, 张宏浩, 陈越渠, 左彤彤, 王君, 孙伟, 2012. 蝽蟊抗寒性对快速冷驯化的响应及其生理机制. 应用生态学报, 23(3): 791–797.]
- Li Y, Hao YJ, Zhang YJ, Si FL, Chen B, 2013. Cloning, bioinformatic analysis and diapause-related expression of trehalose-6-phosphate gene from the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(4): 329–338. [李源, 郝友进, 张玉娟, 司风玲, 陈斌, 2013. 葱蝇海藻糖-6-磷酸合成酶基因的克隆、序列分析及滞育相关表达. 昆虫学报, 56(4): 329–338.]
- Ma GL, Xu LL, Tang GW, Chen B, 2015. Effects of low and changing temperatures on embryonic development in the migratory locust. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 419–427. [马国兰, 徐玲玲, 唐国文, 陈兵, 2015. 低温和变温诱导对飞蝗胚胎发育的影响. 应用昆虫学报, 52(2): 419–427.]
- Matsuda H, Yamada T, Yoshida M, Nishimura T, 2015. Flies without trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2): 1244–1255.
- Michaud S, Marin R, Westwood JT, Tanguay RM, 1997. Cell-specific expression and heat-shock induction of Hsps during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 110(17): 1989–1997.
- Mitsumasu K, Kanamori Y, Fujita M, Iwata K, Tanaka D, Kikuta S, Watanabe M, Cornette R, Okuda T, Kikawada T, 2010. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedium vanderplanki*. *FEBS Journal*, 277(20): 4215–4228.

- Murphy TA, Wyatt R, 1964. Enzymatic regulation of trehalose and glycogen synthesis in the fat body of an insect. *Nature*, 202(4937): 1112–1113.
- Qin JM, Luo SD, He SY, Wu J, 2015. Researching in characters and function of trehalose and trehalase in insects. *Journal of Environmental Entomology*, 37(1): 163–169. [秦加敏, 罗术东, 和绍禹, 吴杰, 2015. 昆虫海藻糖与海藻糖酶的特性及功能研究. *环境昆虫学报*, 37(1): 163–169.]
- Qin W, Neal SJ, Robertson RM, Westwood JT, Walker VK, 2005. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 14(6): 607–613.
- Qin Z, Wang S, Wei P, Xu CD, Tang B, Zhang F, 2012. Molecular cloning and cold-induced expression of trehalose-6-phosphate synthase gene in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 651–658. [秦资, 王甦, 魏苹, 徐彩娣, 唐斌, 张帆, 2012. 异色瓢虫海藻糖合成酶基因的克隆及低温诱导表达分析. *昆虫学报*, 55(6): 651–658.]
- Santos R, Alves-Bezerra M, Rosas-Oliveira R, Majerowicz D, Meyer-Fernandes JR, Gondim KC, 2012. Gene identification and enzymatic properties of a membrane-bound trehalase from the ovary of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 81(4): 199–213.
- Shi Q, Chung JS, 2014. Trehalose metabolism in the blue crab *Callinectes sapidus*: isolation of multiple structural cDNA isoforms of trehalose-6-phosphate synthase and their expression in muscles. *Gene*, 536(1): 105–113.
- Shi ZK, Liu XJ, Xu QY, Qin Z, Wang S, Zhang F, Wang SG, Tang B, 2016. Two novel soluble trehalase genes cloned from *Harmonia axyridis* and regulation of the enzyme in a rapid changing temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 198: 10–18.
- Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP, 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 16(4): 435–443.
- Singer MA, Lindquist S, 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology*, 16: 460–468.
- Tang B, Chen J, Yao Q, Pan ZQ, Xu WH, Wang SG, Zhang WQ, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 813–821.
- Tang B, Qin Z, Shi ZK, Wang S, Guo XJ, Wang SG, Zhang F, 2014. Trehalase in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): effects on beetle locomotory activity and the correlation with trehalose metabolism under starvation conditions. *Applied Entomology and Zoology*, 49(2): 255–264.
- Tang B, Xu QY, Zhao LN, Wang SG, Zhang F, 2014. Progress in research on the characteristics and functions of trehalose and the TPS gene in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1397–1405. [唐斌, 徐青叶, 赵丽娜, 王世贵, 张帆, 2014. 昆虫海藻糖及其合成酶基因的特性与功能研究进展. *应用昆虫学报*, 51(6): 1397–1405.]
- Tang B, Zheng HZ, Xu Q, Zou Q, Wang GJ, Zhang F, Wang SG, Zhang ZH, 2011. Cloning and pattern of expression of trehalose-6-phosphate synthase cDNA from *Catantops pinguis* (Orthoptera: Catantopidae). *European Journal of Entomology*, 108(3): 355–363.
- Terblanche JS, Marais E, Chown SL, 2007. Stage-related variation in rapid cold hardening as a test of the environmental predictability hypothesis. *Journal of Insect Physiology*, 53(5): 455–462.
- Wiemken A, 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(3): 209–217.
- Xu J, Bao B, Zhang ZF, Yi YZ, Xu WH, 2008. Identification of a novel gene encoding the trehalose phosphate synthase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Glycobiology*, 19(3): 250–257.
- Yang MM, Zhao LN, Shen QD, Xie GQ, Wang SG, Tang B, 2016. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, DOI: 10.1002/ps.4287.
- Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose—the blood sugar in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 832–837. [于彩虹, 卢丹, 林荣华, 王晓军, 姜辉, 赵飞, 2008. 海藻糖: 昆虫的血糖. *昆虫知识*, 45(5): 832–837.]
- Yue L, Zhou ZS, Liu ZB, Guo JY, Wan FH, 2014. Effects of rapid cold hardening in different intensities on the physiological indices related to cold tolerance in adults of *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(6): 631–638. [岳雷, 周忠实, 刘志邦, 郭建英, 万方浩, 2014. 不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫耐寒性生理指标的影响. *昆虫学报*, 57(6): 631–638.]
- Yue M, Lei ZR, Zhu BZ, Yao JM, 2009. High temperature tolerance and thermoregulation behavior of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(10): 1103–1109. [岳梅, 雷忠仁, 朱彬洲, 姚君明, 2009. 东亚飞蝗耐高温能力及其体温调节行为. *昆虫学报*, 52(10): 1103–1109.]
- Zhou SX, Lu X, Zhang GH, Li LJ, Ding Y, 2014. Research on the induction and termination of diapause in *Trichogramma dendrolimi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 45–52. [周淑香, 鲁新, 张国红, 李丽娟, 丁岩, 2014. 松毛虫赤眼蜂滞育诱导及解除条件研究. *应用昆虫学报*, 51(1): 45–52.]