

梨小食心虫滞育与非滞育幼虫过冷却能力与体内主要生化物质含量*

郭婷婷¹ 凌飞³ 张顺益¹ 于毅² 李丽莉^{2**} 许永玉^{1**}

(1. 山东农业大学植物保护学院 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院植物保护研究所 济南 250100;
3. 山东日照国际海洋城投资有限公司建设管理部 日照 276800)

摘要 梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck) 是我国北方果园中重要的果树害虫, 现已成为泰安肥城桃园中为害最为严重的一种食心虫。本文主要测定了梨小食心虫滞育与非滞育幼虫的过冷却能力与体内主要生化物质的含量。研究表明; 在 26℃ 的温度条件下, 滞育幼虫的过冷却点与结冰点均低于非滞育幼虫, 但差异均不显著。滞育幼虫体内的含水量、糖原和蛋白质含量均极显著低于非滞育幼虫, 但是滞育幼虫体内的总脂肪、甘油和海藻糖含量均极显著高于非滞育幼虫。研究结果说明, 滞育幼虫在体内生理生化代谢做了调整, 以应对不利环境条件的来临。

关键词 梨小食心虫, 滞育, 自由水, 脂肪, 甘油, 海藻糖, 糖原, 蛋白质

The super-cooling ability and biochemical substances in diapausing and non-diapausing larvae of *Grapholitha molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae)

GUO Ting-Ting¹ LING Fei³ ZHANG Shun-Yi¹ YU Yi² LI Li-Li^{2**} XU Yong-Yu^{1**}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;
2. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. Department of Constructional Administration, Rizhao International Ocean City Investment Co. Ltd, Rizhao 276800, China)

Abstract The oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck), is an important pest of peach and other fruit crops in north China. Previous research found that this moth did the most serious harm to peach crops in Feicheng, Tai'an. In this paper, the super-cooling ability and biochemical substances in diapausing and non-diapausing larvae of *G. molesta* were determined. The results show that, at a temperature of 26℃, the super-cooling point (SCP) and freezing point (FP) of diapausing larvae were lower than those of non-diapausing larvae, but that this difference was not significant. The free-water, glycogen and protein content of diapausing larvae were significantly lower than in non-diapausing larvae, however total-fat, glycerin and trehalose in diapausing larvae were significantly higher than in non-diapausing larvae. These results indicate that diapausing larvae may adjust their biochemical processes to enhance resistance to colder temperatures.

Key words *Grapholitha molesta*, diapauses, free-water, total-fat, glycerin, trehalose, glycogen, protein

昆虫滞育指昆虫受到不利环境的某种信号刺激, 通过体内一系列生理、生化变化的编码过程, 诱导其生长、发育和繁殖停止的现象 (Tauber *et al.*, 1986; 刘流等, 2010)。滞育后昆虫代谢强度低, 抗逆性强, 可以在恶劣的环境下 (如严冬酷暑) 生存下来。滞育是昆虫避开不良环境保持后代种群的必要条件 (徐卫华, 1999; 许永玉, 2001; 仵均祥, 2002)。滞育对于昆虫有非常重要的意义, 一方面可以使昆虫度过不利环境, 维持个体和种群的生存, 另一方面可使种群发育齐一, 增加雌雄个

* 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研项目 (201103024)。

** 通讯作者, E-mail: xuyy@sdaa.edu.cn; zbsli3@163.com

收稿日期: 2013-09-16, 接受日期: 2013-10-29

体的交配机率,利于产生后代(徐卫华,1999)。滞育一旦发生,通常会持续一段时间,并不因不利环境条件的解除而立即结束,发育也不会立即恢复。梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck) 是我国北方果园中发生和为害严重的害虫之一,其发生直接影响果品的产量和质量,并降低果品生产的经济效益(北京农业大学,1981)。梨小食心虫属于兼性滞育昆虫,目前,国、内外关于梨小食心虫滞育方面的研究主要集中于环境因子对滞育诱导的影响及滞育后生长发育状况(Dickon, 1950; Chaudhry, 1956; 蔡明飞, 2010; 何超等, 2011), 对于滞育虫态的耐寒能力与相关机制研究很少。本文主要对滞育与非滞育梨小食心虫的过冷却能力与体内主要生化物质的含量进行了研究,期望对提高梨小食心虫预测预报水平、了解其暴发成灾的原因及制定科学合理的综合防治措施提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及饲养方法

采集肥城桃园桃梢上的梨小食心虫幼虫,带回室内于人工气候室中(温度 $T = (26 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 $\text{RH} = 70\% \pm 10\%$ 、光周期 $\text{L:D} = 15:9$)连续饲养,幼虫期饲喂苹果和人工饲料,待蛹羽化为成虫,取初羽化成虫按雌雄比 1:1 配对,5 对放入一个马灯罩中,底部放置硫酸纸(10 cm $\times$ 20 cm),供其产卵,用蘸有 5% 蜂蜜水的棉球作为成虫补充营养源。取初孵幼虫放入装有人工饲料的试管内,每管一头,棉塞封口。蔡明飞(2010)发现, 26°C 条件下梨小食心虫临界光周期为 $\text{L:D} = 11 \text{ h } 48 \text{ min}: 12 \text{ h } 12 \text{ min}$,为此将分装好的幼虫一部分继续在 $T = (26 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 $\text{RH} = 70\% \pm 10\%$ 、光周期 $\text{L:D} = 15:9$ 条件下饲养,得到非滞育幼虫;其他转移到 $T = (26 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 $\text{RH} = 70\% \pm 10\%$ 、光周期 $\text{L:D} = 9:15$ 条件下饲养 4~5 周后获得滞育幼虫。

滞育幼虫判断标准参考何超等(2011)的方法,当同期孵化的所有个体羽化后,尚未进入预蛹的幼虫则判断为滞育个体。

1.2 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫过冷却点和结冰点的测定

实验采用热电偶的原理进行过冷却点(super-cooling point, SCP)和结冰点(freezing point, FP)的测定(鄧伦山, 2005),所用仪器为 DCW-3506 型低

温恒温槽(宁波市海曙天恒仪器厂)、Temp32 型数据采集器(中国农业科学院农业气象研究所)。滞育与非滞育幼虫均以单头幼虫为一次重复,重复 37 次。

1.3 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内自由水含量的测定

分别取单头非滞育和滞育幼虫,置于电子天平上称得鲜重(fresh weight, FW),然后在 60°C 的恒温烘箱中烘烤 48 h 至恒重,称得干重(dry weight, DW)后计算虫体自由水含量。以单头幼虫为一次重复,重复 26 次。计算公式如下:自由水含量 = $[(\text{鲜重} - \text{干重}) / \text{鲜重}] \times 100$ 。

1.4 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内主要生化物质的测定

1.4.1 总脂肪含量 取测完含水量的梨小食心虫滞育和非滞育幼虫,参照郭海波(2006)的方法进行测定,以单头幼虫为一次重复,重复 26 次。

1.4.2 甘油含量 采用过碘酸钠法测定,参考张拥军(2007)并在其基础上加以改进。每次试验分别取发育进度一致的梨小食心虫非滞育与滞育幼虫,以单头幼虫为一次重复,重复 6 次。

1.4.3 海藻糖含量 采用蒽酮比色法测定,试验方法参考张拥军(2007),每次试验取发育进度一致的梨小食心虫滞育与非滞育幼虫,以单头幼虫为一次重复,重复 6 次。

1.4.4 糖原含量 采用蒽酮比色法测定,标准曲线的制定和试验方法参考宋南和罗梅浩(2007),每次试验分别取单头滞育和非滞育幼虫测定,以单头幼虫为一次重复,重复 18 次。

1.4.5 蛋白质含量 采用 Bradford 法(宋南和罗梅浩, 2007),每次试验分别取单头滞育和非滞育幼虫测定,以单头幼虫为一次重复,重复 19 次。

1.5 数据分析

利用 SPSS 17.0 for windows 数据分析软件,进行组间均值数据的 One-Way ANOVA 方差分析与独立样本 t -test。

2 结果与分析

2.1 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫过冷却点和结冰点

在 26°C 条件下,梨小食心虫滞育幼虫 SCP 和 FP 均低于非滞育幼虫(图 1)。非滞育幼虫和滞育

幼虫的 SCP 分别为 $(-15.48 \pm 0.50)^{\circ}\text{C}$ 和 $(-17.25 \pm 0.33)^{\circ}\text{C}$, t -检验差异不显著 ($t = 2.957, df = 72, P > 0.05$); FP 分别为 $(-9.64 \pm 0.59)^{\circ}\text{C}$ 和 $(-11.03 \pm 0.55)^{\circ}\text{C}$, t -检验差异不显著 ($t = 1.712, df = 72, P > 0.05$)。

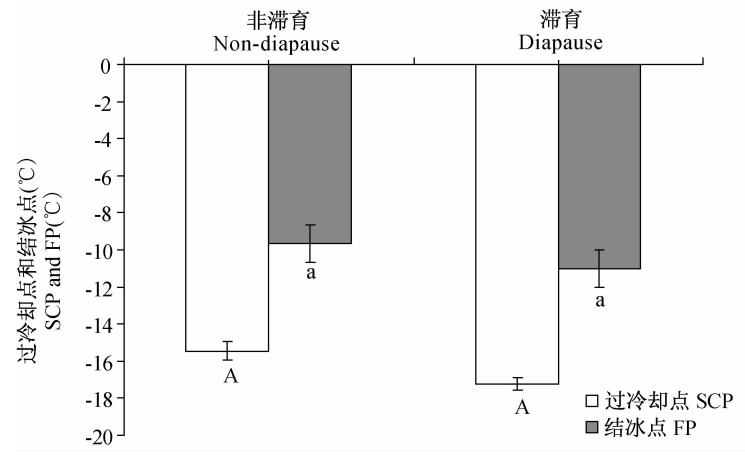


图 1 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫过冷却点和结冰点

Fig. 1 The SCP and FP of non-diapausing and diapausing larvae of *Grapholitha molesta*

注:图中不同大写字母与小写字母分别表示非滞育与滞育幼虫 SCP 和 FP 的差异显著。
Histograms with different capital letters and small letters indicate significant difference of SCP and FP between non-diapause and diapause larvae.

2.2 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内自由水含量

非滞育幼虫与滞育幼虫体内自由水含量分别为 $70.91\% \pm 0.67\%$ 、 $65.31\% \pm 0.54\%$ (图 2),二者差异极显著 ($t = 6.522, df = 50, P < 0.001$)。

2.3 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内主要生化物质含量

梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内主要生化物质含量测定结果如图 3 所示,滞育幼虫体内总脂肪含量 ($24.87\% \pm 0.68\%$) 极显著高于非滞育

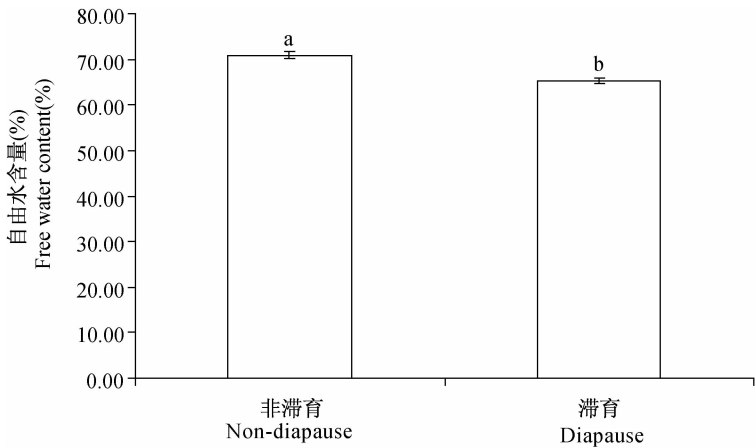


图 2 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内自由水含量

Fig. 2 Free-water content in the non-diapause and diapause larvae of *Grapholitha molesta*

注:图中不同小写字母表示非滞育与滞育幼虫自由水的差异显著。
Histograms with different small letters indicate significant difference of free-water content between non-diapause and diapause larvae.

幼虫 ($17.46\% \pm 0.65\%$) ($t = -7.868, df = 50, P < 0.001$)。滞育幼虫与非滞育幼虫体内甘油含量分别为 (15.36 ± 1.25) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、(6.99 ± 0.74) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，二者差异极显著 ($t = -5.768, df = 10, P < 0.001$)。滞育幼虫体内海藻糖含量为 (32.99 ± 1.05) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，极显著高于非滞育幼虫海藻糖含量 (14.54 ± 0.92) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($t = -13.131, df = 10, P < 0.001$)。

滞育幼虫体内糖原含量 (6.53 ± 0.24) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 低于非滞育幼虫体内糖原含量 (14.70 ± 0.77) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，且二者差异极显著 ($t = 10.098, df = 34, P < 0.001$)。滞育和非滞育幼虫体内蛋白质含量分别为 (92.13 ± 2.26) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、(121.28 ± 4.73) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，二者差异极显著 ($t = 5.739, df = 36, P < 0.001$)，滞育后梨小食心虫幼虫体内蛋白质含量降低。

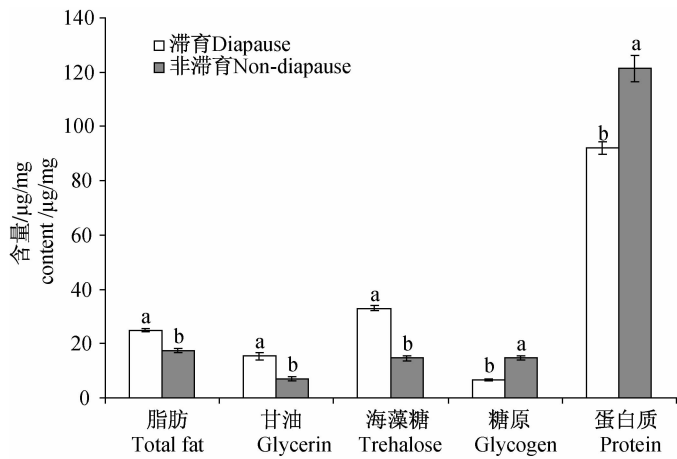


图 3 梨小食心虫非滞育与滞育幼虫体内主要生化物质含量

Fig. 3 The main biochemical substance content in non-diapausing and diapausing larvae of *Grapholitha molesta*

注:图中不同小写字母表示非滞育与滞育幼虫脂肪、甘油、海藻糖、糖原和蛋白质的差异显著。

Histograms with different small letters indicate significant difference of total-fat, glycerin, trehalose, glycogen and protein content between non-diapause and diapause larvae.

3 讨论

对于同一种昆虫来说,过冷却点和结冰点的降低,会提高其存活率和耐寒性 (Nedved *et al.*, 1995;Hodkova and Hoddek,1997)。鄧伦山(2005)对中华通草蛉的研究发现,对于滞育的个体,较低的 SCP 是提高其存活率的重要因子。Denlinger (1991)将昆虫滞育与耐寒性的关系分为昆虫滞育与耐寒无关系,滞育与耐寒同时发生,耐寒与滞育无关系以及耐寒是昆虫滞育的组成部分 4 大类。本研究中梨小食心虫实验种群在 26℃ 和短光照 (L9: D15) 诱导滞育后 SCP 和 FP 降低,说明梨小食心虫的滞育与耐寒性有关系。

滞育后的昆虫会在体内合成和积累各种抗寒物质,如脂肪、糖类、多元醇(主要是甘油)等,以增强自身抵抗能力从而安全度过不良环境 (Lee, 1991;Li *et al.*, 2000)。脂类是胚后阶段昆虫滞育重要的能量储存形式,Hoshikawa (1987) 发现豆蜂

缘蝽 *Riptortus clavatus* 滞育成虫比非滞育个体脂肪含量平均高 20%,金纹细蛾 (Li *et al.*, 2002)、甘蓝夜蛾 (Ding *et al.*, 2003) 滞育后也有相似规律。Barnes (1956) 等人的研究均表明昆虫滞育期间甘油含量较高,而非滞育状态甘油含量较低,仵均祥 (2002) 研究发现麦红吸浆虫滞育程度越深,甘油含量越高。Hayakawa 和 Chino (1982) 根据昆虫滞育期间糖醇类物质积累的差异,提出滞育昆虫的糖醇积累可分为 2 种类型:一种为糖原积累型;另一种为海藻糖积累型。朱芬 (2006) 发现大斑芜菁滞育个体海藻糖含量明显高于非滞育个体,并随着滞育深度的加深迅速积累;糖原含量则随滞育的进行逐渐减少。蛋白质与脂肪之间可以相互转化 (王荫长, 1993)。王生等 (2011) 指出松毛虫赤眼蜂诱导滞育期间蛋白质的消耗可能转化成甘油等物质,以增强其抗寒性。本研究发现,梨小食心虫滞育期间通过脂肪、甘油、海藻糖等的积累增强其抵御逆境的能力,同时消耗蛋白质和糖原来满

足其物质与能量代谢的需求,因此推测自然条件下的越冬种群在滞育期间也可能出现相类似的物质含量变化。有关梨小食心虫在自然界滞育与耐寒性规律及机制有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- Barnes HF, 1956. Gall midges of economic importance. *Gall Midges of Ceareal Crop.*, 7:557 – 581.
- Chaudhry GU, 1956. The development and fecundity of the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck) under controlled temperatures and humidities. *Bulletin of Entomological Research*, 46:869 – 898.
- Denlinger DL, 1991. Relationship between cold hardness and diapause//Lee RE, Denlinger DL (eds.). *Insect at Low Temperature*. New York:Chapman and Hall. 174 – 198.
- Dickon RC, 1950. Factors governing the induction of diapause in the oriental fruit moth. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 42: 511 – 537.
- Ding L, Li YP, Goto M, 2003. Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation. *J. Insect Physiol.*, 49 (12):1153 – 1159.
- Hayakawa Y, Chino H, 1982. Phosphofructokinase as a possible key enzyme regulating glycerol or trehalose accumulation in diapausing insects. *Insect Biochem.*, 12 (6):639 – 642.
- Hodkova M, Hodek I, 1997. Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in relation to diapause of *Parkers apterus* (L). (Heteroptera). *Cryobiologist*, 34:70 – 79.
- Hoshikawa K, 1987. Interconversion between glycogen and inositol in hibernating adults of a phytophagous lady beetle *Epilachna vigintioctomaculata*. *Insect Biochem.*, 17(2):265 – 268.
- Lee RE, 1991. Principles of insect cold hardness//Lee RE, Denlinger DL (eds.). *Insects at Low Temperature*. New York:Chapman and Hall. 17 – 46.
- Li YP, Gong H, Park HY, 2000. Biochemistry and physiological over-wintering in the mature larvae of the pine needle gall midge. *Cryoletters*, 21:149 – 156.
- Li YP, Oguchi S, Goto M, 2002. Physiology of diapause and cold hardness in overwintering pupae of the apple leaf miner *Phyllonorycter ringoniella* in Japan. *Physiol. Entomol.*, 27(2):92 – 96.
- Nedved O, Hodkova M, Brunnhofer V, Hodek L, 1995. Simultaneous measurement of low temperature survival and supercooling in a sample of insects. *Cryoletters*, 16:108 – 113.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S, 1986. *Seasonal Adaptations of Insect*. New York:Oxford University Press. 411.
- 北京农业大学, 1981. 果树昆虫学(下册). 北京:农业出版社. 322 – 326.
- 蔡明飞, 2010. 温度和光周期对梨小食心虫 *Grapholitha molesta* 生长发育和滞育的影响. 硕士学位论文. 杨凌:西北农林科技大学.
- 郭海波, 2006. 中华通草蛉成虫越冬与滞育的生理生化机制. 硕士学位论文. 泰安:山东农业大学.
- 何超, 孟泉科, 花蕾, 陈文, 2011. 光周期对梨小食心虫滞育诱导的影响. *生态学报*, 31(20):6180 – 6185.
- 刘流, 贺莉芳, 刘晖, 晏容, 2010. 昆虫滞育的研究进展. *安徽农业科学*, 38(14):7409 – 7411.
- 宋南, 罗梅浩, 2007. 不同食料对棉铃虫齿唇姬蜂体内主要代谢物质的影响. *西北农林学报*, 16(6):242 – 245.
- 王生, 阮长春, 张俊杰, 孙光芝, 2011. 松毛虫赤眼蜂滞育及解除滞育阶段主要物质含量变化. *吉林农业大学学报*, 33(4):367 – 370, 375.
- 王荫长, 1993. *昆虫生物化学*. 北京:农业出版社. 61 – 66.
- 件均祥, 2002. 麦红吸浆虫滞育与化学物质变化研究. 博士学位论文. 杨凌:西北农林科技大学.
- 徐卫华, 1999. 昆虫滞育的研究进展. *昆虫学报*, 42(1): 100 – 107.
- 许永玉, 2001. 中华通草蛉的滞育机制和应用研究. 博士学位论文. 杭州:浙江大学.
- 张拥军, 2007. 二化螟越冬幼虫耐寒性及其机理研究. 硕士学位论文. 武汉:华中农业大学.
- 鄧伦山, 2005. 中华通草蛉成虫滞育与耐寒性研究. 硕士学位论文. 泰安:山东农业大学.
- 朱芬, 2006. 大斑芜菁的滞育诱导、滞育发育及滞育解除. 博士学位论文. 武汉:华中农业大学.