南美斑潜蝇的快速冷耐受及其生理生化效应*

张君怡[1**] 张小香[1] 宋 英[3**] 常亚文[1] 杜予州[1, 2***]

（1. 扬州大学园艺与植物保护学院暨应用昆虫研究所，扬州 225009；
2. 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室，扬州 225009；3. 江苏太湖地区农业科学研究所，苏州 215155）

摘 要 【目的】为明确南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* 经快速冷耐受（Rapid cold hardening，RCH）处理后的基础耐寒性的变化，以探究南美斑潜蝇 RCH 的生理生化机制。【方法】根据初步筛选的胁迫温度和驯化时间的结果，将南美斑潜蝇蛹直接进行低温胁迫（Cold shock，CS）和先进行 RCH 驯化后再进行低温胁迫（RCH+CS）后，记录南美斑潜蝇蛹的羽化率；利用热电偶方法测定驯化后和未驯化蛹的过冷却点；分别采用气相色谱-质谱仪联用法（GC-MS）、液相色谱-质谱联用技术（HPLC-MS）及分光光度计测定不同处理模式下南美斑潜蝇的脂肪酸、糖类以及甘油的含量。【结果】经 RCH 驯化后再进行低温胁迫的南美斑潜蝇蛹的羽化率显著增加（由 20.00%增至 45.56%，$F_{4, 10}$=10.37，P<0.05），但过冷却点（SCP）却没有明显变化（未驯化 - 19.90 ℃，驯化后 - 20.10 ℃，t=0.703，P>0.05）；RCH 驯化后南美斑潜蝇体内棕榈油酸含量增加（由 5.96%增至 19.26%，$F_{3, 8}$=52.717，P<0.05），棕榈酸含量下降（由 24.32%降至 2.94%，$F_{3, 8}$=65.456，P<0.05），总不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸比值升高（由 2.17 增至 10.94，$F_{3, 8}$=64.347，P<0.05）；RCH 驯化后南美斑潜蝇体内的海藻糖（由 5.46 μg/mg 增至 7.71 μg/mg，$F_{3, 8}$=9.912，P<0.05）和甘油的含量升高（由 1.177 μg/mg 增至 1.314 μg/mg，$F_{3, 8}$=6.428，P<0.05），而葡萄糖含量下降（由 1.84 μg/mg 降至 1.22 μg/mg，$F_{3, 8}$=191.298，P<0.05）。【结论】南美斑潜蝇 RCH 与脂肪酸的不饱和度增加以及海藻糖、葡萄糖和甘油这 3 种抗冻物质均有关。

关键词 南美斑潜蝇；快速冷耐受；耐寒性；脂肪酸；抗冻物质

Physiological and biochemical effects of rapid cold hardening in *Liriomyza huidobrensis*

ZHANG Jun-Yi[1**] ZHANG Xiao-Xiang[1] SONG Ying[3] CHANG Ya-Wen[2] DU Yu-Zhou[1, 2***]

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. Joint Laboratory for International Cooperation in Agriculture and Agricultural Product Safety, Ministry of Education, Yangzhou 225009, China; 3. Taihu Agricultural Research Institute of Jiangsu, Suzhou 215155, China)

Abstract **[Objectives]** To determine changes in the basic cold tolerance of *Liriomyza huidobrensis* after undergoing rapid cold hardening (RCH), and to investigate the physiological and biochemical effects of RCH in this species. **[Methods]** According to the results of a pilot study of temperature stress and acclimation time, the emergence rate of *L. huidobrensis* pupae was recorded after RCH acclimation and subsequently under low temperature stress (CS). A thermocouple was used to determine the supercooling point of acclimated and unacclimated pupae. GC-MS, HPLC-MS and spectrophotometer were used to determine the amount of fatty acids, sugars and glycerol in pupae under different temperature treatments. **[Results]** The emergence rate of *L. huidobrensis* pupae increased significantly (20.00% to 45.60%)($F_{4, 10}$=10.37, P<0.05) after RCH acclimation and subsequent exposure to low temperature stress but their supercooling point (SCP) did not change significantly (unacclimated: - 19.90 ℃, after acclimation: - 20.10 ℃)(t=0.703, P>0.05). After RCH, the content of palmitoleic acid

*资助项目 Supported projects：江苏现代农业（西甜瓜）产业技术体系绿色防控创新团队（JATS [2020] 309）；大学生创新训练项目（X20190581）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：1310372231@qq.com；465078148@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received：2021-07-27；接受日期 Accepted：2021-10-19

increased (from 5.96% to 19.26%) ($F_{3, 8}$=52.717, P<0.05) whereas the content of palmitic acid decreased (from 24.32% to 2.94%) ($F_{3, 8}$=65.456, P<0.05). The ratio of total unsaturated fatty acids to saturated fatty acids increased (from 2.17 to 10.94) ($F_{3, 8}$=64.347, P<0.05). After acclimation, trehalose content increased (5.46 μg/mg to 7.71 μg/mg) ($F_{3, 8}$=9.912, P<0.05), glycerol content increased (from 1.177 μg/mg to 1.314 μg/mg) ($F_{3, 8}$=6.428, P<0.05) and glucose content decreased (from 1.84 μg/mg to 1.22 μg/mg) ($F_{3, 8}$=191.298, P<0.05). **[Conclusion]** RCH in *L. huidobrensis* causes an increase in unsaturated fatty acids and cryoprotectants, including trehalose, glucose and glycerin.

Key words *Liriomyza huidobrensis*; rapid cold hardening; cold tolerance; fatty acids; cryoprotectant

昆虫在应对自然界中的低温环境时，一般通过降低其体液结冰点或过冷却点来防止体液结冰，同时体内产生小分子抗冻物质如甘油、海藻糖等，防止冰晶产生的抗冻蛋白和相关酶类等（王宪辉等，2003）。除此之外，昆虫还会通过增加细胞膜的不饱和度使细胞膜排列错落以增加流动性，从而防止细胞膜结冰，达到抵御寒冷的目的（Koštál，2010）。一般来说，很少有昆虫能够极度耐寒，所以它们需依靠各种低温驯化的方式来提高耐寒能力。快速冷耐受（Rapid cold hardening，RCH）是昆虫应对天气骤变的临时抗冻策略，它是指昆虫在短暂经历较温和的低温后，再经历温度胁迫，能够迅速增强其抵抗低温伤害能力的现象（Lee *et al*，1987）。而这种抵抗低温能力的提高，通常只需经历几分钟到几小时的短暂低温驯化（Lee *et al.*，1987；张小香等，2021）。同样的，昆虫在 RCH 过程中，也会产生生理生化变化，在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、棕榈蓟马 *Thrips palmi*、豆野螟 *Maruca vitrata*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 中均发现，RCH 会导致抗冻物质的积累（Overgaard *et al.*，2007；Park and Kim，2013，2014；Park *et al.*，2014；Kim *et al.*，2017）。并且，RCH 还会导致黑腹果蝇和红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 体内不饱和脂肪酸含量的增加和不饱和度的总体增加，进而提高细胞膜在低温下的流动性（Overgaard *et al.*，2005，2006；Michaud and Denlinger，2006）。

南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* Blanchard 是世界蔬菜上的重要害虫之一，隶属双翅目、潜蝇科 Agromyzidae，斑潜蝇属 *Liriomyza*，主要分布在美洲、亚洲、非洲和欧洲等许多国家。其成虫舐吸危害叶片，幼虫钻蛀叶片和茎秆形成半透明蛇形潜道，使得植物光合作用减少。2020 年春夏，巴西的番茄上南美斑潜蝇的暴发危害，使得番茄产量降低了 15%（Lopes *et al.*，2020）。所以针对南美斑潜蝇的种群分布监测和防治尤为重要，而低温是决定植食性昆虫地理分布的关键因素（Bale *et al.*，2002）。昆虫在冬季的存活率以及采取的低温驯化策略能够影响其今后的种群数量水平。已有研究报道，根据不同纬度下南美斑潜蝇过冷却点数据，推测南美斑潜蝇会逐渐向北分布扩散（陈兵和康乐，2003）。Chen 和 Kang（2004）在 0、5 和 10 ℃的实验条件下对南美斑潜蝇的蛹分别进行 1、4、8 和 12 d 的驯化，然后放入 - 10 ℃胁迫 12 h，使得蛹的羽化率在直接胁迫的基础上明显提高。以上研究都证明南美斑潜蝇具有一定低温适应能力，所以探究其快速冷耐受以及背后的机制有利于害虫的监测和防治。

目前昆虫的 RCH 研究大部分集中在模式生物上，而有关南美斑潜蝇的快速冷驯化的研究尚未见报道，为此本文对南美斑潜蝇的 RCH 进行研究，测定经过 RCH 后其体内脂肪酸和抗冻物质含量的变化，分析其 RCH 的生理生化机制。这对探讨南美斑潜蝇的低温适应能力及机制具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试昆虫南美斑潜蝇种群由中国科学院动物研究所提供。在室内，采用四季豆 *Phaseolus vulgaris* 进行多代饲养后备用。室内饲养温度（24±1）℃，湿度为 60%-70%，光暗比为 16∶8。本试验选择 5 日龄蛹作为实验对象。

1.2 温度处理

1.2.1 识别温度和驯化时间筛选 识别温度是指将昆虫从正常饲养温度直接转移至低温下处理一段时间（一般为 2 h）后，存活率为 15%-30%时所对应的温度，这一温度是 McDonald 等（1997）设置的一个标准冷胁迫温度，以便更好的比较不同预处理后昆虫的存活率。本文设置了 - 9、 - 10、 - 11、 - 12 和 - 13 ℃ 5 个温度梯度，每个温度下处理 2 h，每个温度 3 个重复，每个重复 30 头蛹。按上述设置将低温处理后的蛹放入光照培养箱中，观察其羽化情况，并统计羽化率。根据获得的 5 组数据拟合得出线性回归方程，选择羽化率为 20%的温度作为识别温度。

将虫样分别在 0 ℃下处理 0.5、1、2 和 4 h，再放入识别温度进行低温胁迫。处理结束后放入光照培养箱中观察并记录其羽化率，最后选择羽化率最高的胁迫处理时间为驯化时间。实验共设置 3 个生物学重复，每个重复 30 头蛹。

1.2.2 RCH 处理和样品保存 温度处理的虫样分为 4 组（CK：常温状态；RCH：仅 0 ℃驯化；RCH+CS：0 ℃驯化+低温胁迫 - 12.1 ℃；CS：直接低温胁迫 - 12.1℃），每组 3 个重复，每个重复 60 头蛹。将虫样放入 1.5 mL 离心管中，并称重。按照筛选出的低温胁迫温度和驯化时间，将虫样放入设定好温度的低温恒温水浴槽中，对虫样进行 RCH 温度处理。将处理后虫样放入 - 70 ℃超低温冰箱冷冻保存，用于后续实验。

1.3 过冷却点测定

将供试蛹与在热敏电阻（探头）充分接触，并连接热电偶温度记录仪，然后将探头置入冰箱中，观察温度变化，在温度一直降低的过程中，出现突然的回升，此时的温度即为过冷却点，回弹达到的温度即为结冰点。对常温状态下、RCH 驯化后的 5 日龄蛹分别进行测定，记录未驯化和驯化后的过冷却点和结冰点，每组处理 30 头蛹。

1.4 脂肪酸含量测定

采用气相色谱-质谱法测定常温状态下 CK 和经 RCH、RCH+CS、CS 处理后南美斑潜蝇脂肪酸的含量，温度处理方法祥见 1.2.2。

前处理：将收集的南美斑潜蝇蛹放入 0.1 mL 石油醚中研磨匀浆，再加入 0.9 mL 石油醚浸泡 15 h。之后在冷冻离心机中以 10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液，再加入与上清液等量的 0.4 $mol \cdot L^{-1}$ KOH-甲醇溶液震荡反应进行甲酯化。静置 10 min 后沿离心管壁加 0.1 mL 蒸馏水混匀，等下半部分水相液体澄清后，吸取上清液，通过滤膜加至分析瓶中，然后采用气质联用仪进行分析。

GC/MS 条件：毛细管柱为 DB-5MS（25 m× 0.25 mm），固定相膜厚 0.25 μm。载气（氦气，纯度 99.99%），流速为 1.0 mL/min，恒馏操作，分流比为 50∶1，进样口温度为 250 ℃，柱温从 100 ℃（保持 2 min）以 5 ℃/min 升至 280 ℃（保持 2 min）。GC/MS 接口温度和离子源温度均为 250 ℃，扫描范围和速度分别为 50-550 m/z 和 1.61 scans/s。溶剂延迟 3 min。实验共设置 3 次重复。

1.5 糖类抗冻物质含量测定

采用液相色谱-质谱法测定糖类含量，温度处理同 1.2.2。将试虫称重后用 80%乙醇研磨，研磨后在 15 ℃下离心 10 min，取上清液作为小分子糖来源，将上清液蒸干后加入 0.5 mL 流动相（30%水+70%乙腈）溶解固体沉淀，用有机相滤膜过滤，注入 1.5 mL 进样瓶中，用高效液相测出各物质的出峰时间和峰面积。然后配制海藻糖和葡萄糖的标准溶液，浓度梯度为 400、200、160、100 $\mu g \cdot g^{-1}$。用上述同样方法处理并进样，测出各物质 4 个浓度的出峰面积，绘制标准曲线，得到线性回归方程，根据试样的出峰面积算出对应浓度，再根据公式算出每管虫样的糖类物质的含量。实验共设置 3 次重复。

$$\text{糖类物质的含量（}\mu g / mg\text{）} = \frac{\text{浓度} \times \text{体积}}{\text{蛹的质量}}。$$

1.6 甘油含量测定

采用分光光度计测定甘油含量，温度处理同 1.2.2。向样品中加入 100 μL 蒸馏水，用自制的圆头塑料棒研磨，充分匀浆，用 400 μL 蒸馏水

分 3 次冲洗塑料棒。12 000 r·min^{-1} 室温离心 10 min，将上清液转移至 10 mL 试管中。沉淀加入蒸馏水 500 μL 摇匀，再离心一次，合并上清液。每管中加入氧化剂 2 mL（总上清液的两倍），摇匀，加入显色剂 2 mL 充分混和后，置于 60 ℃水浴中加热显色 15 min，完成后用流水冷却。用超微量分光光度计在 420 nm 波长下进行比色分析，用空白对照溶液调零点，记录吸光度值。然后配制甘油浓度分别为 400、200、100、50 μg·g^{-1} 的标准溶液。按以上方法进行氧化、显色和分析，以甘油浓度为纵坐标，吸光度值为横坐标绘制出标准曲线，得到线性回归方程，算出各组虫样的甘油浓度，再根据公式算出每管虫样的甘油的含量。实验共设置 3 次重复。

$$甘油含量（\mu g/mg）=\frac{甘油浓度\times体积}{蛹的质量}。$$

1.7　数据分析

采用 SPSS 数据分析软件，使用 One-way ANOVA 方法，对不同处理下驯化时间，脂肪酸组成、含量和抗冻物质含量进行方差分析，然后采用 LSD 检验法进行多重比较；使用 Student's *t*-test 方法，对驯化前后的过冷却点和结冰点进行分析。对于方差分析，分析数据均符合正态分布的要求，显著性水平取 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　识别温度

以胁迫温度为横坐标，蛹的羽化率为纵坐标，对不同胁迫温度下南美斑潜蝇的羽化率数据做散点图（图 1），并以此进行回归方程拟合，得到直线方程 $y=16.667x+220.88$，决定系数 $R^2=0.981\,3$，依据该方程绘制出相应的曲线（图 1）。

由图 1 看出，随着胁迫温度的降低，蛹的羽化率也逐渐下降，当羽化率为 20%时，依据线性回归方程计算出的对应温度为 - 12.1 ℃，此温度即为识别温度。

2.2　驯化时间

南美斑潜蝇在 0 ℃条件下，不同驯化时间蛹的羽化率结果见图 2。方差分析后结果表明，南美斑潜蝇蛹驯化 1、2 和 4 h 与驯化 0.5 h 和 0 h 相比蛹的羽化率存在显著差异（$F_{4,\ 10}=10.37$，$P<0.05$），但驯化 0.5 h 与未驯化得到的羽化率差异不显著（$P>0.05$）；同时驯化 1、2 和 4 h 后的羽化率没有显著差异（$P>0.05$），但驯化 4 h 后蛹的羽化率最高。因此，在后续试验的处理中选择 4 h 为驯化时间。驯化 4 h 后再经历胁迫，蛹的羽化率为 45.6%，显著高于识别温度下（即驯化 0 h）蛹的羽化率（20%），说明驯化显著提高

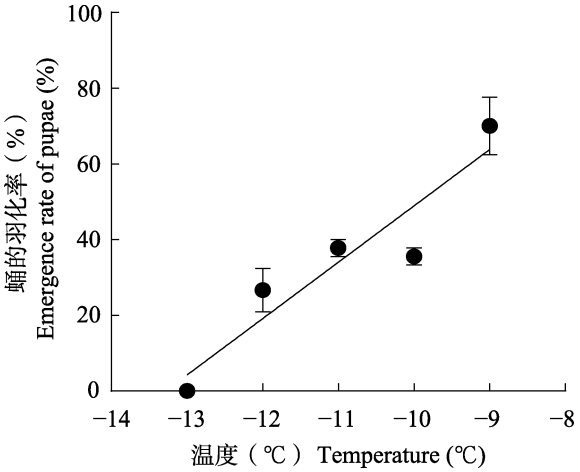

图 1　不同胁迫温度下南美斑潜蝇蛹的羽化率

Fig. 1　The emergence rate of pupae at different stress temperatures

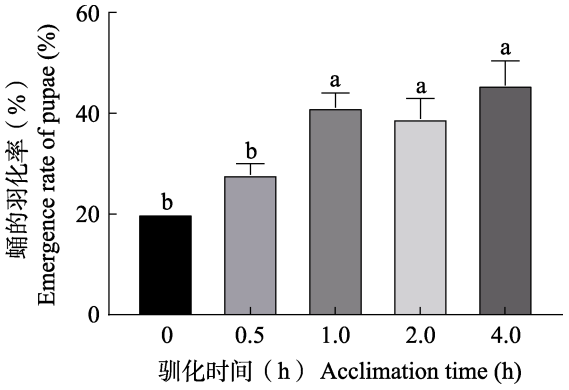

图 2　不同驯化温度 RCH 后蛹的羽化率

Fig. 2　The emergence rate of pupae after RCH at different hardening temperatures

图中数据为平均数±标准误，柱上标有不同小写字母表示经 LSD 多重比较法检验差异显著（$P<0.05$）。

Data in the table are mean±SE, and histograms with diffrenence lowercase letters indicate significant diffrence at the 0.05 level by LSD test.

了蛹的羽化率，增强了南美斑潜蝇蛹的低温耐受能力。

2.3 过冷却点

南美斑潜蝇蛹在 0 ℃驯化 4 h 和未低温处理的过冷却点和结冰点如表 1 所示。常温状态下的南美斑潜蝇蛹的过冷却点为（ - 19.9±0.2 ）℃，结冰点为（ - 14.5±1.1 ）℃；而在 0 ℃下驯化 4 h 后，蛹的过冷却点为（ - 20.1±0.2 ）℃，结冰点为（ - 15.3±0.2 ）℃。方差分析结果表明，未低温驯化的与经过 0 ℃ 驯化 4 h 的南美斑潜蝇蛹的过冷却点（ t=0.703 ， P>0.05 ）和结冰点（ t=0.715，P>0.05 ）无显著差异，这说明短时间的低温驯化不会改变其固有的过冷却点和结冰点。

2.4 各处理组饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸含量

不同处理后的南美斑潜蝇蛹体内共检测到 5 种脂肪酸，包括 3 种不饱和脂肪酸（棕榈油酸、亚油酸和亚麻酸）和 2 种饱和脂肪酸（棕榈酸和硬脂酸）（表 2）。由表 2 可知，RCH 处理后南美斑潜蝇体内的棕榈油酸（ $F_{3, 8}$=52.717，P<0.05 ）、棕榈酸含量（ $F_{3, 8}$=65.456，P<0.05 ）；和不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值（ $F_{3, 8}$=64.347，P<0.05 ）与其他处理组之间存在显著差异。南美斑潜蝇蛹在仅 0 ℃驯化后，体内棕榈油酸含量从常温对照下的 5.96%增加到 19.26%，棕榈酸含量从 24.32%降低至 2.94%，整体不饱和度从 2.17 增加至 10.94；但驯化后再暴露于识别温度（RCH+CS），脂肪酸组成结果与 CK 组和 CS 组无差异；RCH+CS 组与 CS 组脂肪酸组成无差异说明在胁迫温度前即使经过 4 h 的 0 ℃驯化，其脂肪酸酸含量也无明显变化；同时直接放入胁迫温度后与常温状态相比也无显著改变。这表明 RCH 驯化会引发脂肪酸组成的变化，而直接的低温胁迫则不能。

表 1 未驯化和驯化后过冷却点和结冰点

Table 1 Unhardened and after hardened supercooling point (SCP) and freezing point (FP)

不同处理 Treatments	过冷却点（℃） Supercooling point (℃)		结冰点（℃） Freezing point (℃)	
	平均数±标准误 Mean±SE	最低至最高 Range	平均数±标准误 Mean±SE	最低至最高 Range
CK	- 19.9±0.2a	- 20.7— - 17.4	- 14.5±1.1a	- 17.5— - 11.3
RCH	- 20.1±0.2a	- 21.1— - 17.2	- 15.3±0.2a	- 17.5— - 12.2

CK：常温对照组；RCH：仅在 0 ℃下经历 4 h 驯化。同列数据后标有相同字母表示差异不显著（ t-test ）。

CK: Normal temperature control group; RCH: Only experienced 4 h at 0 ℃. The data followed by the same lowercase letters indicate no significant difference by t-test.

表 2 不同处理间脂肪酸组成和含量

Table 2 Fatty acid composition and content between different groups

不同处理 Treatments	不同脂肪酸（μg/mg） Fatty acid (μg/mg)					
	棕榈油酸 16：1（n-7）亚油酸 18：2（n-6）亚麻酸 18：3（n-3）			棕榈酸 16：0	硬脂酸 18：0	UFA/SFA
CK	5.96±1.50b	5.20±2.04a	56.60±6.90a	24.32±2.04a	7.91±1.57a	2.17±0.32b
RCH	19.26±1.24a	3.46±0.32a	68.80±2.24a	2.94±0.18b	5.55±0.60a	10.94±0.97a
RCH+CS	4.81±0.12b	2.45±0.22a	62.90±1.58a	22.88±1.09a	6.95±0.87a	2.38±0.21b
CS	4.74±0.11b	3.20±0.26a	64.67±1.06a	21.26±0.88a	6.13±0.61a	2.67±0.19b

CK：常温对照组；RCH：仅在 0 ℃下经历 4 h 驯化；RCH+CS：先在 0 ℃下经历 4 h 驯化，再暴露于 - 12.1 ℃的胁迫温度下；CS：直接暴露于 - 12.1 ℃；UFA/SFA：不饱和脂肪酸总含量/饱和脂肪酸总含量。表中数据为平均数±标准误，同行数据后标有相同字母表示经 LSD 多重比较法检验差异不显著（ P>0.05 ），标有不同字母表示具有显著差异（ P<0.05 ）。

CK: Normal temperature control group; RCH: Only experienced 4 h at 0 ℃; RCH+CS: First exposed to 0 ℃ for 4 h, and then exposed to stress temperature of - 12.1 ℃; CS: Direct exposure at - 12.1 ℃; UFA/SFA: Total content of unsaturated fatty acids/total content of saturated fatty acids. Data in the table are mean±SE, and followed by the same letters in a line indicate no significant difference, while followed by the different letters indicate significant differences at the 0.05 by the LSD test.

2.5　各处理组抗冻物质含量

不同处理下南美斑潜蝇蛹体内海藻糖、葡萄糖和甘油的变化如图 3 所示。海藻糖含量在 CK 组、RCH 组和 RCH+CS 组间差异显著（$F_{3, 8}$= 9.912，P<0.05）（图 3：A），经过驯化的以及直接暴露于胁迫低温的蛹中海藻糖含量均比常温状态下要高，而且相较于仅进行 RCH 处理，在 RCH 后再次放入识别温度下胁迫会使海藻糖含量进一步升高；但直接暴露于 - 12.1 ℃（CS）与仅 0 ℃驯化 4 h（RCH）和 0℃驯化 4 h 后再暴露于 - 12.1 ℃（RCH+CS）这两组数据之间没有显著差异。总的来说从图上显示趋势来看，常温下的蛹，经过 0 ℃、4 h 处理、再经历低温胁迫，海藻糖含量逐渐升高，在 RCH+CS 后其含量最高。这表明 RCH 驯化和低温胁迫都能诱发海藻糖含量上升。

经不同处理的南美斑潜蝇蛹体内葡萄糖含量存在显著性差异（$F_{3, 8}$=191.298，P<0.05）（图 3：B）。常温下的蛹，经历了 0 ℃驯化 4 h（RCH）和先 RCH 处理、再经历低温胁迫（CS），葡萄糖含量逐渐降低，并且 RCH+CS 组葡萄糖含量最低；除此之外，蛹在直接低温胁迫（CS）后，葡萄糖含量相比对照组有所增加，并且直接低温胁迫（CS）组的葡萄糖含量最高。这表明 RCH 驯化后会导致葡萄糖含量下降，直接低温胁迫则能诱导葡萄糖含量的上升，但在胁迫前进行的 RCH，会抵消低温胁迫造成的葡萄糖含量升高的影响，使最终葡萄糖含量下降。

RCH 组、RCH+CS 组、CS 组的甘油含量均与对照组存在显著性差异（$F_{3, 8}$=6.428，P<0.05），但不同的温度处理组之间的甘油含量无显著差异（图 3：C）。与对照相比，3 个低温处理组的南美斑潜蝇蛹体内的甘油含量均显著提高。这说明 0 ℃驯化和 - 12.1 ℃胁迫均能导致甘油含量的增加。

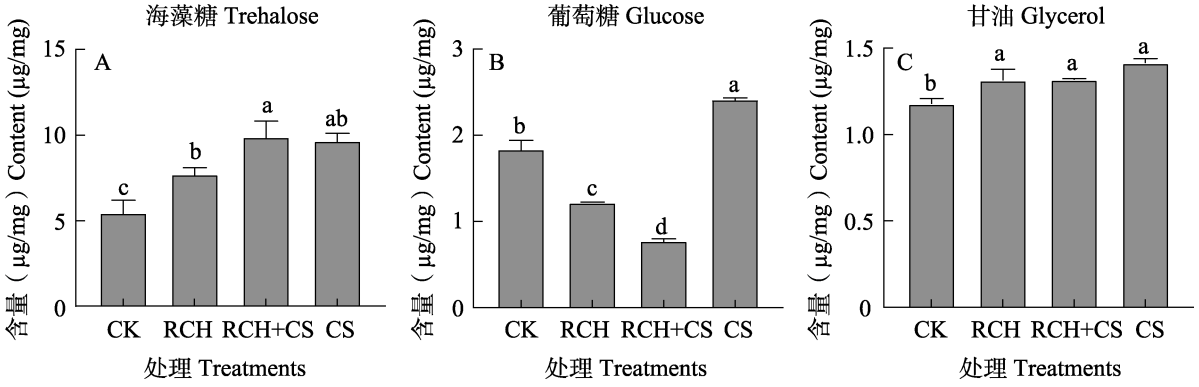

图 3　不同处理下各抗冻物质含量变化

Fig. 3　Changes of cryoprotectant content in different treatments

CK：常温对照组；RCH：仅在 0 ℃下经历 4 h；RCH+CS：先在 0 ℃下经历 4 h，再暴露于 - 12.1 ℃的胁迫温度下；CS：直接暴露于 - 12.1 ℃。

CK: Normal temperature control group; RCH: Only experienced 4 h at 0 ℃; RCH+CS: First exposed to 0 ℃ for 4 h, and then exposed to discriminating temperature of - 12.1 ℃; CS: Direct exposure at - 12.1 ℃.

3　结论与讨论

曾经的观点认为直接暴露在低温下的这一急剧变温过程似乎不能作为生态相关的耐受性指标或参考，因为自然条件下昼夜温度波动不会如此剧烈。但已有多个试验证明在相对温和的低温下进行快速冷耐受一样能显著提高昆虫维持生态功能的能力，包括繁殖能力（Coulson and Bale，1992；Kelty and Lee，1999；Rinehart *et al.*，2000）。例如，果蝇成虫在 0.1 ℃或 0.05 ℃/min 的速率下从 23 ℃冷却到 0 ℃后，低温耐受性增强（Kelty and Lee，1999）。低温胁迫导致红尾肉蝇 *S. crassipalpis* 雄虫的受精率从（74.8±5.3）% 降至（8.4±3.0）%，但在胁迫前加上 RCH 使得

受精率提高到（42.2±3.7）%，RCH 减轻了这种生育能力的损失（Rinehart *et al.*，2000）。- 7 ℃的亚致死低温胁迫会减少家蝇 *Musca domestica* 的产卵量，而经历 0 ℃的 RCH 能提高其繁殖力（Coulson and Bale，1992）。以上研究证明 RCH 有其重要的生态意义。

因为驯化温度、驯化时间和识别温度的不同组合会导致驯化程度的不同，为了更好的探究南美斑潜蝇 RCH 的生态和生理效应，在温度处理之前，需要选择驯化程度最高的组合，驯化温度参考了前人（Lee *et al.*，1987；MacMillan *et al.*，2009）在其他昆虫上所采用的温度，即 0 ℃。通常实验室采用直接降温的温度诱导方案，即将试虫样直接放入 0 ℃中驯化一段时间，再暴露于低温胁迫温度下。本研究将蛹的羽化率作为一个简单易测的指标，用来衡量南美斑潜蝇快速获得的生态相关低温耐受性的高低。与直接暴露于 - 12.1 ℃后蛹的羽化率（20%）相比，南美斑潜蝇蛹经历了 0 ℃驯化 4 h 后再暴露于 - 12.1 ℃，蛹的羽化率增加到 45.6%。这一结果与 Rinehart 等（2000）的研究结果一致，这说明 RCH 能提高南美斑潜蝇蛹的低温耐受性。然而 0 ℃驯化 4 h 后的过冷却点和结冰点却无显著变化，推测可能原因是南美斑潜蝇蛹常温状态下的 SCP（ - 19.9 ℃）和 FP（ - 14.5 ℃）。低于其它近缘入侵斑潜蝇（美洲斑潜蝇越冬蛹的 SCP 和 FP 分别为 - 9.5 ℃和 - 9.2 ℃）（董慈祥等，2001），其本身耐寒性就较高，即使再经过驯化，耐寒性的增加也是微乎其微。此外过冷却点的大小还与纬度高低有关，陈兵和康乐（2003）测定了南美斑潜蝇蛹的昆明种群 SCP 为 - 18.86 ℃，成都种群为 - 20.45 ℃，西安种群为 - 20.63 ℃，北京种群为 - 22.57 ℃，赤峰种群为 - 22.38 ℃，基本上是遵循随纬度变高而递减，过冷却能力随着纬度升高而增加。正是由于南美斑潜蝇具有极强的低温适应能力，所以推测南美斑潜蝇自然种群可能会逐渐向北扩散，因此控制其南方种群向北扩散分布是我们应当采取的防控措施。

此前已有 Overgaard 等（2005）以及 Michaud 和 Denlinger（2006）在黑腹果蝇和红尾肉蝇上发现了 RCH 会导致不饱和脂肪酸含量的增加和不饱和度的增加。本实验对象南美斑潜蝇蛹在经历 0 ℃驯化 4 h 后，不饱和脂肪酸棕榈油酸含量升高，饱和脂肪酸棕榈酸含量降低，从而引起脂肪酸总体的不饱和度增加。在不同昆虫中，含量增加的不饱和脂肪酸的种类有所不同，黑腹果蝇体内显著增加的是亚油酸（从 26.921%升到 27.809%）（Overgaard *et al.*，2005），红尾肉蝇体内显著增加的是油酸（从 30%升到 47%）（Michaud and Denlinger，2006），而本试验发现南美斑潜蝇增加的是棕榈油酸（从 5.96%增加到 19.26%）。除此之外，饱和脂肪酸含量在不同昆虫中的变化也不尽相同，比如黑腹果蝇体内未发现饱和脂肪酸含量的改变（Overgaard *et al.*，2005），红尾肉蝇除了棕榈酸无变化，其他饱和脂肪酸均降低（Michaud and Denlinger，2006），本试验的南美斑潜蝇则是棕榈酸有所降低（从 24.32%降至 2.94%）。除了常温状态和 0 ℃驯化 4 h 后的比较，本文在 Overgaard 等（2005）以及 Michaud 和 Denlinger（2006）研究的基础上增加了 RCH+CS 和 CS 这两个处理，结果表明，这两组处理与常温均无明显差异，说明致死低温胁迫并不会引发脂肪酸组成的变化，而且还会覆盖 RCH 驯化所产生的效应。但由于条件有限，本研究仅测定的是南美斑潜蝇体内所有组织上的脂肪酸总含量，今后需要直接测定细胞膜上磷脂脂肪酸含量，这样才能进一步阐明磷脂脂肪酸含量变化导致的细胞膜重组如何影响南美斑潜蝇的低温耐受能力。

除了不饱和脂肪酸含量的变化，抗冻物质研究是 RCH 生理生化机制中另一主要方面。前人（Lee *et al.*，1987，Michaud and Denlinger，2007）报道的抗冻物质包括海藻糖、葡萄糖、甘油和一些氨基酸等。其中研究发现最多以及变化最显著的是海藻糖，海藻糖是存在于昆虫血淋巴的主要糖类，可以保护蛋白和细胞免受逆境胁迫的损害（冷冻、高温、失水和氧化）。在黑腹果蝇、棕榈蓟马 *T. palmi* 和豆野螟 *M. vitrata* 中均发现 RCH 处理后海藻糖含量的显著升高（Overgaard *et al*，2007；Park *et al.*，2014；Kim *et al.*，2017）。

本试验也得出了相同的结果，即常温下的南美斑潜蝇蛹，经过 0 ℃、4 h 处理、再经历 - 12.1 ℃的胁迫，海藻糖含量逐渐升高，说明南美斑潜蝇在接受驯化时，会产生海藻糖来抵御可能到来的低温胁迫。而直接放入识别温度下也能使南美斑潜蝇蛹体内海藻糖含量显著增加，说明昆虫在遭受急速冷激时也会迅速产生大量海藻糖来抵御低温逆境的胁迫。葡萄糖同样在本试验中有着显著变化，但与海藻糖结果相反。常温状态下的蛹，随着 0 ℃、4 h 处理、再经历胁迫，葡萄糖含量逐渐降低。MacMillan 等（2009）同样发现 RCH 会导致葡萄糖含量的降低。在此过程中，葡萄糖含量下降，海藻糖含量却上升，说明在 RCH 过程中，可能昆虫体内已有的葡萄糖会合成海藻糖，使海藻糖充当此时主要的糖类抗冻物质。但直接暴露于胁迫温度下葡萄糖含量反而增加并且含量最高，说明南美斑潜蝇在遭受快速冷激时也会产生葡萄糖和海藻糖的增加一样，也是一种普遍的应激反应。

除了糖类中的个别物质，甘油也是重要的抗冻物质之一，在经历过 RCH 后的甜菜夜蛾和小菜蛾中，血淋巴甘油浓度上升（Park and Kim，2013，2014）。本研究结果中，凡是放入低温处理的蛹，甘油含量均增加，但不同的低温处理组的结果无明显差异，表明无论是在亚致死低温下（0 ℃）还是致死胁迫低温下（LLT_{80}：- 12.1 ℃），甘油含量都会增加。Yoder 等（2006）也发现肉蝇 *Sarcophaga bullata* 在 - 10 ℃的胁迫下会有甘油的积累，而且对肉蝇直接注射甘油，然后立即放入 - 10 ℃中，其存活率会提高。

本研究发现，南美斑潜蝇的 RCH 生态反应是显著的，其主要表现在蛹羽化率的提高上，但过冷却能力并无明显增强。从机制上看，本文发现南美斑潜蝇的 RCH 驯化与脂肪酸组成有关，具体表现在棕榈油酸含量的增加、棕榈酸含量的减少以及总不饱和度的增加上。此外，试验结果还发现，RCH 后南美斑潜蝇体内存在抗冻物质的含量变化，如海藻糖和甘油的增加、葡萄糖的降低。研究南美斑潜蝇快速冷耐受现象对了解害虫对低温环境变化的适应具有主要意义。近年来，全球变暖愈发严重，世界各地发生旱涝等极端天气，气温异常波动频繁，RCH 作为一种快速耐寒策略，对南美斑潜蝇种群的生存至关重要。在其耐寒性随着气温波动发生变化的同时，害虫种群的分布也会随之发生变化，因此掌握南美斑潜蝇 RCH 特性，为更好地开展该虫的预测预报提供科学依据。

参考文献 (References)

Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmak C, Bezemer TM, Brown V, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Hartley R, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt A, Whittaker JB, 2002. Herbivory in global climate change research: Direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1): 1–16.

Chen B, Kang L, 2004. Variation in cold hardiness of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) along latitudinal gradients. *Environmental Entomology*, 33(2): 155–164.

Chen B, Kang L, 2003. The change of supercooling point of geographic population of pupal *Liriomyza huidobrensis* along latitude and its significance to population diffusion. *Zoological Research*, 24(3): 168–172. [陈兵, 康乐, 2003. 南美斑潜蝇地理种群蛹过冷却点随纬度递变及其对种群扩散的意义. 动物学研究, 24(3): 168–172.]

Coulson SC, Bale JS, 1992. Effect of rapid cold hardening on reproduction and survival of offspring in the house fly *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology*, 38(6): 421–424.

Dong CX, Yang QR, Li GQ, Wang T, Li DB, 2001. Study on the cold tolerance of *Liriomyza sativae* overwintering pupae. *Plant Quarantine*, 15(2): 81–82. [董慈祥, 杨青蕊, 李国, 王涛, 李德斌, 2001. 美洲斑潜蝇越冬蛹耐寒能力的研究. 植物检疫, 15(2): 81–82.]

Kelty JD, Lee RE, 1999. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *Insect Physiology*, 45(8): 719–726.

Kim Y, Lee DW, Jung JK, 2017. Rapid cold-hardening of a subtropical species, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae), accompanies hypertrehalosemia by upregulating trehalose-6-phosphate synthase. *Environmental Entomology*, 46(6): 1432–1438.

Koštál V, 2010. Cell structural modifications in insects at low temperatures//Denlinger DL, Lee RE (eds.). Low Temperature Biology of Insects. Cambridge: Cambridge University Press. 116–140.

Lee RE, Chen CP, Denlinger DL, 1987. A rapid cold-hardening process in insects. *Science*, 238(4832): 1415–1417.

Lopes MC, Costa TL, Ramos RS, Farias ES, Arcanjo LP, Ribeiro AV, Santos AA, Picanço MC, 2020. Parasitoid associated with *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) outbreaks in tomato fields in Brazil. *Agricultural and Forest Entomology*, 22(3): 224–230.

MacMillan HA, Guglielmo CG, Sinclair BJ, 2009. Membrane remodeling and glucose in *Drosophila melanogaster*: A test of rapid cold-hardening and chilling tolerance hypotheses. *Journal of Insect Physiology*, 55 (3): 243–249.

McDonald JR, Bale JS, Walters KFA, 1997. Rapid cold hardening in the western flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 43(8): 759–766.

Michaud MR, Denlinger DL, 2006. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 52(10): 1073–1082.

Michaud MR, Denlinger D, 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): A metabolomic comparison. *Journal of Comparative Physiology B*, 177(7): 753–763.

Overgaard J, Holmstrupa M, Malmendalb A, Sørensenc JG, Bundyd JG, Loeschckec V, Nielsenb NC, 2007. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 53(12): 1218–1232.

Overgaard J, Sørensen JG, Petersen SO, Loeschcke V, Holmstrup M, 2005. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 51(11): 1173–1182.

Overgaard J, Sørensen JG, Petersen SO, Loeschcke V, Holmstrup M, 2006. Reorganization of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Entomology*, 31(4): 328–335.

Park Y, Kim K, Kim Y, 2014. Rapid cold hardening of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Environmental Entomology*, 43(4): 1076–1083.

Park Y, Kim Y, 2014. A specific glycerol kinase induces rapid cold hardening of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Physiology*, 67: 56–63.

Park Y, Kim Y, 2013. RNA interference of glycerol biosynthesis suppresses rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Experimental Biology*, 216(22): 4196–4203.

Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL, 2000. Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Entomology*, 25(4): 330–336.

Wang XH, Qi XL, Kang L, 2003. The phenomenon of rapid cold hardening of insects and its ecological significance. *Progress in Natural Science*, 13(11)：1128–1133. [王宪辉, 齐宪磊, 康乐, 2003. 昆虫的快速冷驯化现象及其生态适应意义. 自然科学进展, 13(11): 1128–1133.]

Yoder JA, Benoit JB, Denlinger DL, Rivers DB, 2006. Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: Evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 202–214.

Zhang XX, Iqbal J, Du YZ, 2021. Research progress on insect's rapid cold hardening. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(2): 256–264. [张小香, JUNAID Iqbal, 杜予州, 2021. 昆虫快速冷耐受的研究进展. 应用昆虫学报, 58(2): 256–264.]