

35°C下烟青虫夏滞育率、蛹重及代谢速率的变化*

张亚南^{1,2} 樊建庭¹ 杨林² 刘柱东^{2**}

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 杭州 310000;

2. 中国科学院动物研究所 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 【目的】 本文旨在研究烟青虫 *Helicoverpa assulta* 在高温下的滞育的发生和生理的变化。

【方法】 高温可以诱导不同龄期的烟青虫进入夏滞育, 本实验在 35°C, L:D=16:8 条件诱导 3 龄、4 龄、6 龄、预蛹期的烟青虫夏滞育, 并比较研究了滞育蛹和非滞育蛹代谢水平的差异。【结果】 研究发现, 在 35°C 下, 烟青虫的 3 龄、4 龄、6 龄幼虫与预蛹期的夏滞育率分别为 25.96%、25.71%、22.76%、11.31%, 3 个幼虫期的滞育率显著高于预蛹期滞育率。不同龄期的滞育诱导中, 雄性的夏滞育率都明显高于雌性夏滞育率。并且, 滞育蛹显著比未滞育蛹重。对滞育蛹和未滞育蛹的失重动态与呼吸代谢速率比较研究, 结果发现: 夏滞育虫蛹的失重曲线平缓, 显著低于未滞育蛹; 并且呼吸代谢速率曲线平缓且显著低于未滞育蛹。【结论】 研究表明, 高温能诱导烟青虫能进入夏滞育, 并且夏滞育蛹能通过维持低的代谢水平来度过不利环境, 具有一定的生态适应意义。

关键词 烟青虫, 夏滞育, 滞育率, 失重曲线, 呼吸代谢速率曲线

The summer diapause rate, pupal weight, and metabolic rate of *Helicoverpa assulta* at 35°C

ZHANG Ya-Nan^{1,2} FAN Jian-Ting¹ YANG Lin² LIU Zhu-Dong^{2**}

(1. College of Forests and Biology, Agriculture and Forest University of Zhejiang, Hangzhou 310000, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract [Objectives] To determine the occurrence of summer diapause and its associated physiological changes in *Helicoverpa assulta* exposed to high temperature. [Methods] Summer diapause in *H. assulta* can be induced by high temperature at different larval stages. In this study, we recorded the diapause rate of *H. assulta* under 35°C and L16:D8 beginning at the third, fourth, sixth larval and pupal stage and compared the pupal weight and metabolic rate of diapausing and non-diapausing pupae. [Results] The summer diapause rates were 25.96%、25.71%、22.76%、11.31%, for third, fourth, sixth, and prepupal stage, respectively. The results show that the diapause rate of the third, fourth and sixth stages was significantly higher than that of the prepupal stage. Furthermore, the summer diapause rates of males were significantly higher than those of females for each tested stage. The pupal weights of diapausing pupae were significantly heavier than those of non-diapausing pupae. We comparatively measured the metabolic levels, using two indices, *i.e.*, body weight loss and respiratory rate, of diapausing and non-diapausing pupae. The weight loss curves of the diapausing pupae were significantly lower than those of the non-diapausing pupae. Moreover, the respiratory rate curve of diapausing pupae was significantly lower than that of non-diapausing pupae. [Conclusion] The results indicate that diapausing pupae can significantly reduce their metabolism

* 资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (31171854) 和教育部留学回国基金

**通讯作者, E-mail: liuzd@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-12-02, 接受日期: 2014-03-02

and delay their development under high temperature to survive adverse environmental conditions.

Key words *Helicoverpa assulta*, summer diapause, diapause rate, the curve of weight loss, the curve of respiratory rate

Dingle (1978) 认为滞育是昆虫生长、发育、繁殖的停顿状态, 是大多数昆虫避开不利物候而采取的季节性适应策略。按照滞育发生的季节, 可以将它分为冬滞育 (Winter diapause) 和夏滞育 (Summer diapause)。相对于春秋两季昆虫处于活跃状态而言, 将昆虫在夏季发生的生长发育或繁殖停顿现象称为夏滞育。昆虫夏滞育是盛夏季节前长日照、高温、干旱和食物短缺等物候条件诱导的, 引起昆虫体内一系列基因和蛋白编码过程的改变, 从而中止其生长发育的一种停顿状态 (Masaki, 1980)。夏滞育相对于冬滞育而言, 研究较少。Masaki (1980) 在统计过去 30~35 年有关休眠 (Dormancy) 的研究文献发现, 只有 10% 的文献报道的是夏滞育。对夏滞育的研究, 目前国内外还停留在夏滞育的诱导 (Induction)、维持 (Maintenance) 和终止 (Termination) 水平上 (Xue and Kallenborn, 1998; Held and Spieth, 1999; Xue *et al.*, 2002), 很少深入到探索生理生化特征的研究 (刘柱东等, 2002, 2004; Liu *et al.*, 2007)。

Tombes (1964) 曾指出, 夏滞育在两性中存在, 表现为 4 个特征: 呼吸率低、含水量低, 脂肪含量高和生殖系统尚未发育完全。吴坤君等 (2000) 发现, 高温可诱导棉铃虫蛹期夏滞育, 滞育诱导的敏感虫态为预蛹, 诱导滞育的临界温度为 33°C, 温度越高, 滞育发生率也越高, 进而从生理水平得到了证实, 表现在显著低的代谢水平 (Liu *et al.*, 2007)。烟青虫 *Helicoverpa assulta* 与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是近缘种, 在形态学、生物学、生态学上有许多类同性, 且二者都

是农作物重要害虫。当前对烟青虫的夏滞育的研究还未见报道。烟青虫是否也具有夏滞育特性?

本研究开展了高温对烟青虫的研究, 预实验表明 35°C 高温能有效地诱导烟青虫滞育, 在 35°C 和 L16:D8 滞育诱导条件下, 比较了不同龄期诱导对夏滞育率的影响; 比较研究夏滞育蛹和未夏滞育蛹的代谢水平的差异, 增加对棉铃虫属昆虫夏滞育系统的理解, 为棉铃虫的综合治理提供理论基础支持。

1 材料与方法

1.1 虫源

供试烟青虫采自湖南湘西, 在室内用人工饲料 (Wu and Gong, 1997) 继代饲养 3 代以上。幼虫用人工饲料在 27°C, L:D=16:8 的光周期条件下饲养, 成虫饲喂 10% 的蜂蜜水。

1.2 夏滞育的判断标准

两个指标可用于决定烟青虫蛹是否滞育: 眼点停留在化蛹时位置的时间长短和蛹腹部脂肪体的状况 (Wilson *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 2006)。在 30~35°C 下, 发育蛹眼点移动平均时间不超过 1.6 d, 以此值的 1 倍, 即化蛹后第 5 天 (实际蛹龄为 4 d) 眼点仍未移动者作为其进入滞育的标准 (吴坤君和龚佩瑜, 2000)。同时用放大镜 (10×) 观察蛹腹部脂肪体是否呈颗粒状作为判断滞育的辅助指标。

1.3 烟青虫高温下的滞育率观察

烟青虫初孵幼虫在培养皿 (d=10 cm) 用人工饲料群养至 3 龄, 然后在玻璃试管 (1.2 cm×10 cm) 中单个饲养 (防止幼虫相互残杀)。饲养温

度为 35℃、光周期为 L16:D8。实验设 4 个处理：分别从 3 龄、4 龄、6 龄、预蛹期开始诱导；每个处理 5 个重复，每组供试虫 80 头。每日观察并记录其蜕皮状况直到化蛹。化蛹后 5 日，按夏滞育判断的标准，判定滞育与否，同时辨别雌雄，统计总夏滞育率和雌雄夏滞育率。

1.4 高温对烟青虫夏滞育蛹眼点停留时间的影响

高温条件下，烟青虫自化蛹后第 2 日，每日检查眼点移动情况，记录高温滞育蛹与未滞育蛹眼点停留时间。其中滞育蛹分为 3 份：1) 一部分一直在 35℃ 条件下观察眼点的移动；2) 一部分高温滞育蛹自化蛹后第 5 日 (实际蛹龄为 4 d)，转移到解除滞育的温度 (27℃) 条件下观察眼点移动；3) 一部分高温滞育蛹自化蛹后第 10 日 (实际蛹龄为 9 d)，转移到解除滞育的温度 (27℃) 条件下，每日检查眼点移动情况。比较 4 种类型蛹眼点停留时间差异。

1.5 烟青虫滞育蛹与未滞育蛹的蛹重及失重曲线比较

取高温 35℃ 处理组蛹若干头 ($n > 50$)，自化蛹后第 2 日 (实际蛹龄为 1 日龄) 起，用万分之一精度的电子天平 (Sartorius research) 称重，记录计算 2、4、6、8 和 10 日龄蛹重，期间判断滞育否。比较原始体重，计算蛹日失重量 $\Delta = M_i - M_{i+2}$ ，其中 i 为蛹日龄，统计蛹失重量及总失重量，绘制失重曲线。

1.6 烟青虫滞育蛹与未滞育蛹呼吸速率的测定

本实验设计测定了不同日龄夏滞育蛹和未滞育蛹的呼吸速率的变化。自化蛹后第 2 日起开始用陆生动物呼吸代谢测量仪器 (易科泰生态技术有限公司) 测量呼吸速率 (以 CO₂ 为指标)，每次测量一头虫蛹，每次测定时间 5 min，测量

温度为 35℃，隔天测量一次，期间判断其滞育否；高温滞育蛹及未滞育蛹各测量 20 头。具体测定方法如下：

(1) 将仪器组装为封闭式小呼吸室测量系统，接通电源；

(2) 调整 SS3 气体二次抽样单元，连接空气；

(3) 流速约为 0.2 L/min；

(4) 待整个装置于测量状态稳定后，逐个将虫蛹放入呼吸室测量；

(5) 用 Expadata 软件记录并分析数据。

1.7 数据分析方法

所有数据用 Spss18.0 软件的 One-way ANOVA 进行方差分析，比较各组之间的差异，同时用 EXCEL 软件绘制图形。

2 结果与分析

2.1 烟青虫高温下滞育率的观察

在本实验中，诱导温度为 35℃，光周期 L:D=16:8 条件下，3 龄、4 龄、6 龄以及预蛹的烟青虫夏滞育率分别为 25.96%、25.71%、22.76%、11.31%。其中 3 龄、4 龄和 6 龄的滞育率差异不显著，显著高于预蛹的滞育率，差异显著 (图 1:A) ($F = 6.260$; $df = 3, 9$; $P = 0.05$)。各处理的烟青虫的雄性滞育率显著高于雌性滞育率 (图 1:B)。

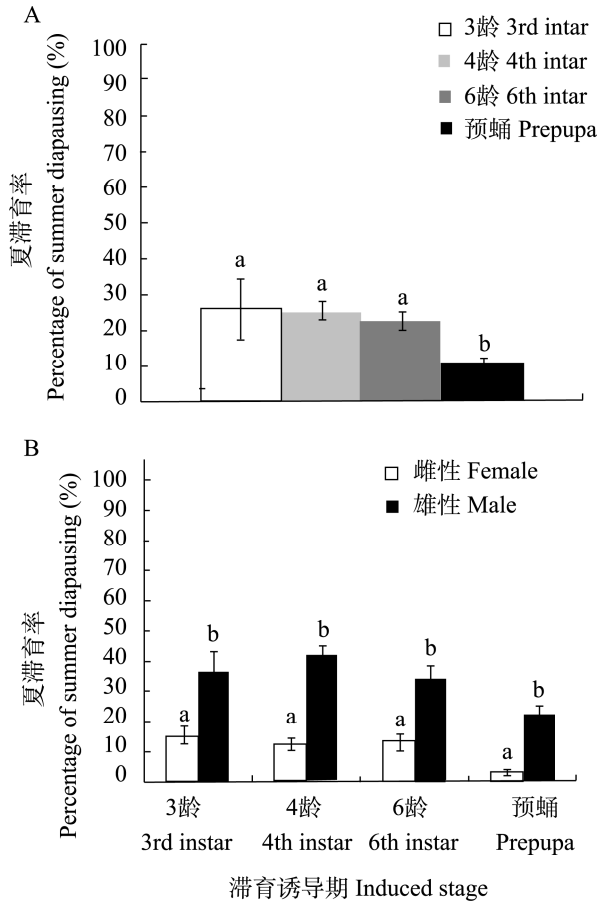


图 1 不同龄期的滞育率

Fig. 1 The percentage of summer diapause of different stage induced

2.2 高温对烟青虫夏滞育蛹眼点停留时间的影响

夏滞育蛹在 35°C 下、5 日龄夏滞育蛹在 27°C 下、10 日龄夏滞育蛹在 27°C 下及未夏滞育蛹在 35°C 下的蛹眼点停留时间分别为：13.43、2.63、2.82、1.97 d 存在显著差别 ($F=169.84$; $df=3, 85$; $P<0.01$)。夏滞育蛹在 35°C 条件下眼点停留时间显著长于其他 3 种蛹, 并且有很多夏滞育蛹在高温下眼点停留不动长达一个月直到干死。在滞育解除条件下, 滞育蛹眼点停留时间显著长于未滞育蛹 ($F=131.941$; $df=2, 150$; $P<0.01$) (表 1)。

表 1 不同类型烟青虫蛹眼点停留时间比较

Table 1 Comparison of the retention time of eye spots among four treated pupae

处理 Treatment	样本数 (n) Replicates (n)	眼点停留时间 (d) Retention of eye spots (d)
35°C下滞育蛹 Diapausing pupae at 35°C	30	13.43±1.0 a
35°C下未滞育 Non-diapausing pupae at 35°C	70	1.97±0.13 c
27°C下 4 日龄夏滞育蛹 4-d-old diapausing pupae at 27°C	41	2.82±0.17 b
27°C下 9 日龄夏滞育蛹 9-d-old diapausing pupae at 27°C	45	2.63±0.16 b
<i>F</i>		169.84
<i>df</i>		3,185
<i>P</i>		< 0.01

表中数据为平均值±标准误 (mean±SE), 数据后标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$, Duncan's 多重比较)。

The data in the table are mean±SE, and those followed by different letters indicate significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

2.3 烟青虫滞育蛹与未滞育蛹的蛹重差别

化蛹后第 2 日体重即为初始蛹重,夏滞育蛹与未滞育蛹的初始蛹重 (mg) 分别为: 267.97、247.19, 夏滞育蛹显著比未夏滞育蛹重 ($F = 12.231$; $df = 1, 224$; $P = 0.01$)。

蛹失重曲线显示在 35°C 高温条件下, 夏滞育蛹失重曲线平缓, 体重变化极小, 平均为 2.5 mg/d; 而未滞育蛹则呈现线性增长, 最高达到 10 mg/d (图 2)。

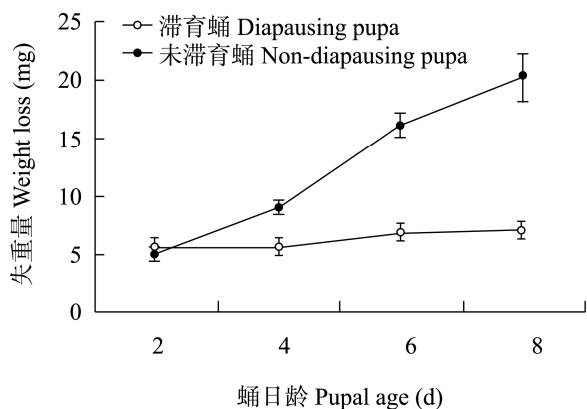


图 2 不同类型蛹失重曲线
Fig. 2 Curves of weight loss between diapausing and non-diapausing pupae

2.4 烟青虫滞育蛹与未滞育蛹呼吸速率的测定

对不同日龄夏滞育蛹与未滞育蛹 CO₂ 呼出速率测定结果如图 3, 该结果表明在 35°C 高温下, 不同日龄的未滞育蛹呼吸速率均显著高于夏滞育蛹。化蛹后, 夏滞育蛹的呼吸速率动态曲线近乎平稳, 但未滞育蛹呼吸速率在化蛹后逐渐上升, 二者的最高呼吸速率分别达到 6.46×10^{-5} mol/kg/min、 5.76×10^{-4} mol/kg/min。

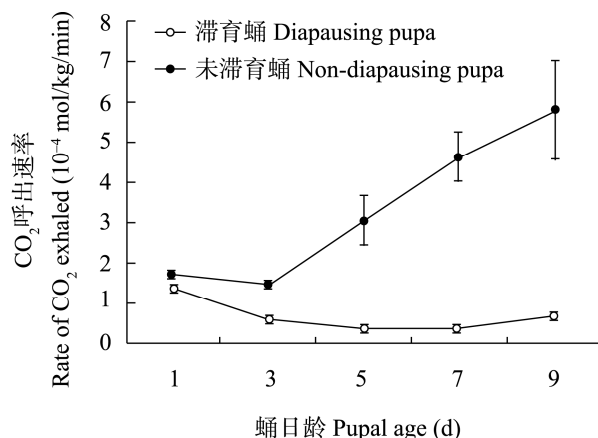


图 3 不同类型蛹呼吸速率曲线
Fig. 3 Curves of respiratory rate between diapausing and non-diapausing pupae

3 讨论

3.1 烟青虫高温下滞育率的观察

对于高温诱导昆虫不同龄期进入夏滞育的研究不多, 有报道高温对烟青虫近缘种棉铃虫的影响 (Nibouche, 1998; 吴坤君和龚佩瑜, 2000; 刘柱东等, 2001)。33°C 为诱导棉铃虫幼虫进入夏滞育的临界温度, 且滞育个体绝大部分为雄性 (吴坤君和龚佩瑜, 2000)。本实验测定了不同龄期烟青虫夏滞育率, 结果发现, 3 龄、4 龄、6 龄的幼虫夏滞育率显著高于预蛹的, 而 3 龄、4 龄、6 龄之间滞育率没有差异, 说明 6 龄和预蛹期是烟青虫夏滞育诱导的敏感虫期。但其近缘种棉铃虫的夏滞育的高温敏感期却在预蛹期, 其夏滞育敏感虫期与烟青虫不同。此外, 同棉铃虫一致, 烟青虫夏滞育个体中雄性占绝大多数。推测是因为高温对雄性的影响要大于对雌性的影响, 因此种群进化出偏雄性的夏滞育机制。是否和棉铃虫那样, 烟青虫夏滞育的生态适应意义将具有

* 资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (31171854) 和教育部留学回国基金

**通讯作者, E-mail: liuzd@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-12-02, 接受日期: 2014-03-02

重要研究意义。

3.2 高温对烟青虫夏滞育蛹眼点停留时间的影响

当高温滞育昆虫转移到适宜的温度环境下,并不马上发育,而是要经过一段时间的滞育发育(Diapause development)(Andrewartha, 1952)。本实验结果表明,烟青虫的夏滞育蛹在转移至27°C时,眼点移动时间显著长于未滞育蛹的眼点移动时间,表明有滞育解除反应期的存在,从而证明烟青虫的夏滞育并不是一般意义上的休眠(Dormancy)或者热静止(Thermal quiescence),而是一种真正的夏滞育。

3.3 烟青虫滞育蛹与未滞育蛹的蛹重及呼吸速率的差别

鳞翅目昆虫的蛹重是衡量其适合度的一个间接指标,蛹越大,适合度越高(Leuck and Perkins, 1972; Storer *et al.*, 2001),此外,低的呼吸率是滞育昆虫的共有特点,也被用作判断滞育的生理指标(Litsinger and Apple, 1973; Kostal *et al.*, 1998; 刘柱东等, 2002)。有研究发现,棉铃虫冬滞育蛹的呼吸代谢速率在很长时间内维持在极低水平,且显著低于非滞育蛹(吴坤君等, 1989; 王方海和龚和, 1997)。因此本实验从烟青虫蛹期的体重与呼吸速率的变化,推测其代谢水平的强弱,对夏滞育蛹和未滞育蛹做了比较研究。我们的研究发现,夏滞育蛹体重显著大于高温未滞育蛹,说明烟青虫在能量储备上已经作了应对不良环境的准备。在生理水平上,失重曲线和呼吸代谢曲线变化一致,说明了烟青虫通过进入夏滞育虫态保持低水平代谢,减少能量过度消耗来适应高温环境。

参考文献 (References)

Andrewartha HG, 1952. Diapause in relation to the ecology of

insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 27(1): 506107.

Dingle H, 1978. *Evolution of Insect Migration and Diapause*. New York: Springer. 41652.

Held C, Spieth HR, 1999. First evidence of pupal summer diapause in *Pieris brassicae* L.: The evolution of local adaptedness. *J. Insect Physiol.*, 45(5): 5876598.

Kostal V, Sula J, Simek P, 1998. Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause. *J. Insect Physiol.*, 44(2): 1656173.

Leuck RE, Perkins WD, 1972. A method of evaluating fall armyworm progeny reduction when evaluations control achieved by host plant resistance. *J. Econ. Entomol.*, 65(2): 4826483.

Litsinger JA, Apple JW, 1973. Estival diapause of the alfalfa weevil in Wisconsin. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 66(1): 11616.

Liu ZD, Gong PY, Wu KJ, Sun JH, Li DM, 2006. A true summer diapause induced by high temperatures in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, 54(10): 101261020.

Liu ZD, Gong PY, Wu KJ, Wei W, Sun JH, Li DM, 2007. Effects of larval host plants on over-wintering preparedness and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, 53 (10): 101661026.

Masaki S, 1980. Summer diapause. *Annu. Rev. Entomol.*, 25(1): 1625.

Nibouche S, 1998. High temperature induces diapause in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Exp. Appl.*, 87(3): 2716274.

Storer NP, van Duyn JW, Kennedy GG, 2001. Life history traits of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on non- Bt and Bt transgenic corn hybrids in Eastern north Carolina. *J. Econ. Entomol.*, 94(5): 126861279.

Tombes AS, 1964. Seasonal changes in the reproductive organs of the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), in south Carolina. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 57(4): 4226426.

Wilson AGL, Lewis T, Cunningham RB, 1979. Overwintering and spring emergence of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Namoi Valley, New South Wales. *Bull. Entomol. Res.*, 69(1): 976109.

Wu KJ, Gong PY, 1997. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. *Entomol. Sin.*, 14(3): 2776282.

Xue FS, KallenbornHG, 1997. Control summer andwinter diapause in pupae of the cabbage butterfly, *Pieris melete* Menetries. *J.*

- Insect Physiol.*, 43(8): 7016707.
- Xue FS, Spieth HR, Li AQ, Hua A, 2002. The role of photoperiod and temperature in determination of summer and winter diapause in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Insect Physiol.*, 48(3): 2796286.
- 刘柱东, 龚佩瑜, 吴坤君, 2001. 高温处理棉铃虫对其子代生长发育的影响//李典谟编. 昆虫与环境. 北京: 中国农业科技出版社. 56–60. [Liu ZD, Wu KJ, Gong PY, 2001. Performance of the progeny from *Helicoverpa armigera* (Hübner) suffered from high temperature. In *Entomology and Environment*, Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, pp. 56–60.]
- 刘柱东, 吴坤君, 龚佩瑜, 2002. 昆虫夏滞育. 昆虫知识, 39 (3): 234–237. [Liu ZD, Wu KJ, Gong PY, 2002. Summer diapause in insects. *Entomological Knowledge* 39(3): 234 – 237.]
- 刘柱东, 吴坤君, 龚佩瑜, 2002. 昆虫夏滞育的调控及其遗传基础. 昆虫知识, 39: 261–264. [Liu ZD, Wu KJ, Gong PY, 2002. Regulation and genetic basis of summer diapause in insects. *Entomological Knowledge* 39(4): 261 – 264.]
- 刘柱东, 龚佩瑜, 吴坤君, 李典谟, 2004. 高温条件下棉铃虫化蛹率、夏滞育率和蛹重的变化. 昆虫学报, 47(1) : 14–19. [Liu ZD, Wu KJ, Gong PY, Li DM, 2004. Effects of high temperature on incidence of pupation, summer diapause and pupal weight of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Entomologica Sinica* 47(1): 14–19.]
- 吴坤君, 龚佩瑜, 李秀珍, 1989. 棉铃虫越冬蛹呼吸代谢的某些特点. 昆虫学报, 32(2) : 136–143. [Wu KJ, Gong PY, Li XZ, 1989. Characteristics of respiration in overwintering pupae of *Helicoverpa armigera*. *Entomologica Sinica* 32(2): 136 – 143.]
- 吴坤君, 龚佩瑜, 2000. 极端温度对棉铃虫发育和存活的影响//李典谟编. 走向 21 世纪的中国昆虫学. 北京: 中国科学技术出版社. 442–446. [Wu KJ, Gong PY, Li XZ, 2000. Effects of extreme temperature on development and survival of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. In *Entomology in China during 21 Century*, Beijing: Chinese Science and Technology Press, pp. 442–446.]
- 王方海, 龚和, 1997. 滞育和非滞育棉铃虫氧耗率的测定. 中山大学学报, 36 (2) : 58–61. [Wang FH, Gong H, 1997. The measurement of oxygen consumption of *Helicoverpa armigera* diapausing and non-diapausing pupae. *Journal of Sun Yat-sen University* 36(2): 58 – 61]