

大豆食心虫越冬幼虫过冷却点及其体内小分子内含物分析

徐 伟 秦昊东 高 宇 毕 锐 崔 娟 史树森*

(吉林农业大学农学院, 大豆区域技术创新中心, 长春 130118)

摘要: 为研究大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* 越冬幼虫的过冷却能力和耐寒机制, 采用模拟自然埋土法调查越冬幼虫的存活率, 用热电偶法测定越冬前后不同深度土层的幼虫过冷却点, 并通过气相色谱-质谱联用仪检测虫体小分子内含物含量。结果表明, 大豆食心虫越冬幼虫自然种群存活率随所处土层深度加深而显著升高, 地表、地表下 3 cm 和 8 cm 土层的越冬幼虫存活率分别为 5.00%、51.14% 和 91.50%, 土层对越冬幼虫起保护作用; 按体重分组的越冬幼虫, 在相同深度土层中其存活率随体重降低而升高, 且大、小幼虫间存活率差异显著。越冬前结茧滞育的大、中、小幼虫过冷却点分别为 -14.22、-16.30、-17.64℃, 越冬后过冷却点降低, 降低幅度随所处土层深度加深而减少。在越冬幼虫体内检测到海藻糖、葡萄糖和 L-异亮氨酸等 10 种化合物, 海藻糖平均相对含量最高, 为 60.55%, 其次是葡萄糖, 为 1.68%。幼虫过冷却点与海藻糖相对含量呈极显著负相关, 海藻糖对大豆食心虫越冬具有抗冻保护作用; 除甘氨酸外其它 7 种氨基酸类化合物相对含量与幼虫过冷却点呈显著正相关, 相关系数均超过 0.6797。表明上述这些化合物含量的变化能够调节大豆食心虫的抗寒能力。

关键词: 大豆食心虫; 越冬; 存活率; 过冷却点; 小分子物质

Analysis of supercooling point and low-molecular weight compounds in overwintering soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* larvae

Xu Wei Qin Haodong Gao Yu Bi Rui Cui Juan Shi Shusen*

(Innovation Center of Soybean Region Technology, Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China)

Abstract: To study the supercooling capacity and the cold tolerant mechanisms of overwintering soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* larvae, methods of simulation of natural burying soil and thermo-couple were used respectively to investigate the survival rate (SR) of overwintering larvae and to detect supercooling point (SCP) of larvae in the different depths of soil before and after overwintering. Then gas chromatography and mass spectrometry was used to examine the amount of small molecular compounds in the larvae. The results showed that survival rate of the natural overwintering larva population increased significantly with soil depth, and the survival rates of the earth's surface, 3 cm and 8 cm soil layer were 5.00%, 51.14% and 91.50% respectively, which inferred that soil played the protective role for the overwintering larvae. In the same depth of soil layer, the survival rate of larvae grouped by weight increased significantly with the weight decreasing and the survival rate of heavy larvae was significant different with that of the light larvae. Before overwintering, SCPs of heavy, medium and light dia-

基金项目: 国家现代农业(大豆)产业技术体系(CARS-04), 吉林省科技发展计划(20180201015NY)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: sss-63@263.net

收稿日期: 2017-03-27

pausing larvae with cocoons were -14.22 , -16.30 and -16.30°C , respectively, while after overwintering, the SCPs decreased and the decreasing amplitude reduced with the increasing of soil depth, in which the overwintering larvae were located. Ten compounds including trehalose, glucose and L-leucine were detected in the body of overwintering larvae. Among them, relative amount of trehalose was the highest with 60.55%, and the second was glucose with 1.68%. Very significant negative correlation was observed between larvae SCP and the content of trehalose which inferred that trehalose had the cryoprotective effect on overwintering larvae. The significant positive correlations were found between larvae SCP and the relative amount of other seven kinds of amino acids except for glycine with the correlative coefficient over 0.6797. In a word, the relative amounts of the above mentioned small molecular compounds exhibited the regulation capacity of the cold tolerance of *L. glycinivorella*.

Key words: *Leguminivora glycinivorella*; overwintering; survival rate; super-cooling point; low-molecular-weight compounds

大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* 在我国大豆产区常年发生,一般年份虫食率为 15%~30%,减产 5%~10%,严重年份减产 40%,是造成大豆品质降低和减产的主要原因。因此,大豆食心虫的防治也成为大豆生产的重要环节。目前,大豆食心虫的防治仍以化学防治为主,即在成虫发生盛期及幼虫孵化前采取叶面和豆荚喷施药剂,或用敌敌畏乳油制成毒棍进行熏蒸,防治成虫和初孵幼虫(史树森, 2013)。化学防治虽然具有操作简便、收效快、防治效果显著的特点,但是其在杀死害虫的同时也污染了环境、杀伤天敌。

大豆食心虫属专性滞育昆虫,一年发生 1 代,幼虫蛀入豆荚内取食,发育至老熟脱荚,在土层 3~15 cm 处结茧越冬(徐庆丰等, 1965; 史树森, 2013)。大豆食心虫幼虫越冬期长达半年以上,低温是造成其死亡的重要原因。每年长期或短期低温对温带地区昆虫的生命活动造成不同程度的伤害,这些地区的昆虫逐渐形成了对寒冷的抵御能力,Andreadis et al. (2013) 研究发现昆虫通过维持虫体的过冷却状态提高其耐寒性来抵御冻害。过冷却能力与多种因素有关,如适宜的越冬场所,大多数低温生存的昆虫没有特别的适应机制,在寒夜里依赖于栖息地的保护,如石头和倒下的植物茎秆以及枯叶形成的虚室,这些地方由于结冰会释放热量,昆虫由此而获得保护(Somme & Zachariassen, 1981)。此外,昆虫发育阶段、环境季节性变化、遗传因素和营养状况等均能够通过影响昆虫体内的生理生化代谢而改变过冷却点(supercooling point, SCP),从而改变其耐寒性(张洪刚等, 2010; 胡志凤等, 2016)。如 Andreadis et al. (2008) 研究发现欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 5 龄末期非滞育幼虫过冷却点高于 5 龄初期幼虫,滞育 45 d

玉米螟幼虫比滞育 90 d 幼虫过冷却点低; Liu et al. (2007) 发现饲养在玉米和菜豆上的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蛹明显轻于棉花植株上的,且过冷却点显著升高,越冬死亡率分别增加了 20.8% 和 18.0%。在越冬阶段许多昆虫体内化学物质含量发生变化,主要表现为积累低分子量的糖或多元醇,由于其在昆虫血淋巴中具有溶解度高、无毒且相容性好、对酶或代谢过程影响小、能自由跨膜(Storey & Storey, 1988)等特性,可以增加昆虫体内结合水含量,减少自由水含量,降低过冷却点,或直接与酶及其它蛋白质相互作用起到保护生物系统的作用(Watanabe & Tanaka, 1998; 易杰群等, 2015),成为昆虫的抗冻保护剂。抗冻保护剂在特定时期被诱导积累,从而增加了昆虫的耐寒性(景晓红和康乐, 2002; Park & Kim, 2014)。

关于大豆食心虫的越冬机理尚缺乏详细研究,仅有秦昊东等(2015)发现土壤湿度对大豆食心虫幼虫越冬行为有显著影响,脱荚幼虫入土越冬较适宜的土壤含水量为 15.0% 左右。在越冬过程中大豆食心虫越冬场所对其成功越冬有何影响,不同个体间有无越冬差异,以及越冬幼虫体内是否存在抗冻保护剂等尚不清楚。因此,本试验拟通过调查大豆食心虫越冬幼虫存活率,测定其过冷却点及体内小分子内含物含量,分析过冷却点与越冬幼虫存活率及体内小分子化合物的关系,探索大豆食心虫越冬幼虫的抗寒机制,明确该害虫种群发生动态,以期为大豆食心虫预测预报和有效防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:大豆食心虫脱荚幼虫采自吉林农业

大学大豆区域技术创新中心试验田,每个50 mL塑料指形管装有35 g含水量为15%的复合营养土,接入10头幼虫,管壁有通气孔。幼虫分为自然群体和按照体重范围区分的大(>0.015 g)、中(0.015~0.009 g)、小(<0.009 g)3组幼虫,使其完全进入结茧越冬滞育状态,备用。

试剂:乙醇,天津益仁达化工有限公司;二甲基酰胺,国药集团化学试剂有限公司;O-甲基羟胺盐酸盐,烟台奥东化学材料有限公司;三甲基硅烷基咪唑、异辛烷,梯烯爱(上海)化成工业发展有限公司;葡萄糖、海藻糖,上海励瑞生物科技有限公司;赤藓糖、L-异亮氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、L-苏氨酸、琥珀酸、谷酰胺、瓜氨酸标准品纯度均为99%以上,美国Sigma-Aldrich公司。

仪器:SZ61型奥林巴斯体视显微镜,日本奥林巴斯公司;SUN-V型智能过冷却点测定仪,北京鹏程电子科技中心;5975-MARKES气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)联用仪、DB-5色谱柱(长30 m×内径0.25 mm;膜厚0.15 μm),美国Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆食心虫越冬幼虫存活情况调查

根据大豆食心虫在田间越冬土层深度,采取模拟自然埋土法调查其越冬存活情况。将装有大豆食心虫的指形管于2015年9月30日埋于大豆田,设置3个埋土深度,即地表层、地表下3 cm和地表下8 cm。2016年3月1日取出指形管,将越冬幼虫小心取出,在体视显微镜下轻轻剥开外面的茧,用解剖针轻触虫体,有反应的为活虫。逐一调查各管幼虫的存活数,记录自然群体越冬幼虫和大、中、小越冬幼虫的存活数,并计算存活率(survival rate, SR)。

1.2.2 大豆食心虫幼虫过冷却点的测定

取越冬前进入结茧越冬滞育状态的幼虫,以及埋土越冬后于2016年3月1日取出的指形管内存活的大、中、小幼虫。应用过冷却点测定仪测定其过冷却点,将幼虫与自动记录仪一端的热电偶探头连接固定后放入-40℃低温冰箱中,将热电偶用隔热的材料包起来,幼虫则以平均1℃/min的非线性速率降温。当虫体的体液中形成冰晶时,由于潜热的释放导致温度回升,此时万用表上显示的数值即为过冷却点的值。每个处理测定30头幼虫。

1.2.3 大豆食心虫幼虫体内小分子内含物含量的测定

大豆食心虫幼虫越冬后过冷却点的测定值在-6.91~-24.64℃之间,不同虫体间耐寒能力差异

较大,因此根据过冷却点高低将越冬幼虫分为4组,即A组:-7~-12℃,B组:-12~-17℃,C组:-17~-22℃,D组:<-22℃。采用硅烷化衍生物改进的方法以GC-MS联用仪测定虫体小分子内含物的相对含量(Liu et al., 2007; 欧阳芳和戈锋, 2014)。幼虫经蒸馏水冲洗、吸干并称重,放入微量研磨器中加入80%乙醇溶液2 mL(含100 μg 赤藓糖作内标)匀浆,以3 000×g离心15 min,移出上清液置于2 mL进样瓶中,-20℃冰箱内冷冻保存备用。分析前将样液在40℃条件下用氮气吹干,分别加入25 μL二甲基酰胺和25 μL O-甲基羟胺盐酸盐吡啶溶液,70℃水浴15 min,反应混合物中加入75 μL二甲基酰胺和30 μL三甲基硅烷基咪唑,80℃水浴15 min完成硅烷化反应,立刻冰浴停止反应。以150 μL异辛烷萃取衍生物,取1 μL萃取液注入气相色谱仪进行分析。氮气作载气,进样温度280℃,升温程序:120℃保持3 min,以12℃/min升高至280℃保留40 min。质谱离子源温度200℃,电离能70 eV,扫描范围30~300 m/z。检测器为氢离子焰,各组分通过NIST库中的图谱,结合标准化合物的保留时间,进行比较鉴定。每个处理6次重复。

1.3 数据分析

试验数据采用DPS 13.5数据处理系统进行分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。幼虫体内小分子内含物以GC/MS全扫描方式分析其相对含量。对不同过冷却点范围分组的越冬幼虫小分子内含物的相对含量与幼虫过冷却点进行Pearson相关性分析。

2 结果与分析

2.1 土层深度对大豆食心虫越冬幼虫存活率的影响

对不同土层的大豆食心虫越冬幼虫自然种群存活率的调查结果表明,地表、地表下3 cm和8 cm土层深度的幼虫其平均存活率分别为5.00%、51.14%和91.50%,存在显著差异(图1)。裸露在地表的幼虫,由于没有覆盖物,缺乏保温作用,导致大量幼虫死亡,存活率最低;随着土层的深入,存活率升高,这表明土层对越冬幼虫起到保护作用,所形成的小环境有保温效应,在适宜土层深度范围内,土层越深保温效应越强,越冬幼虫存活率也越高。

2.2 大豆食心虫越冬幼虫体重对存活率的影响

按体重分组的大、中、小3个越冬幼虫群体,在地表、地表下3 cm和8 cm土层相同深度中存活率均表现为 $SR_{大} < SR_{中} < SR_{小}$,表明在同一深度土层越冬

幼虫存活率随体重的降低而升高,体重越轻存活率越高,且大、小幼虫间存活率差异显著(表1)。随着土层深度增加,大、中、小幼虫存活率均显著升高,尤其是地表下3 cm土层的大、中、小幼虫存活率较地表同体重幼虫分别升高69.17、73.33和64.33个百分点。

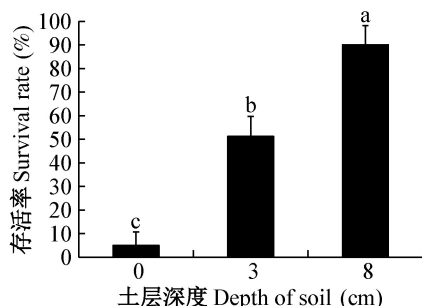


图1 不同深度土层大豆食心虫自然种群越冬幼虫的存活率

Fig. 1 Survival rate of *Leguminivora glycinivorella* overwintering larvae of natural populations at different depths of soil

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

表1 不同体重大豆食心虫越冬幼虫在不同深度土层的存活率

Table 1 Survival rate of *Leguminivora glycinivorella* overwintering larvae with different weights in different soil layers

体重 Weight	存活率 Survival rate (%)		
	0 cm	3 cm	8 cm
大 Heavy	2.50±2.00 Cb	71.67±14.71 Bb	85.71±11.33 Ab
中 Medium	5.00±4.77 Cb	78.33±18.35 Bab	88.57±6.90 Ab
小 Light	17.50±7.08 Ca	81.83±7.76 Ba	95.71±5.35 Aa

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母、同行不同大写字母分别表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column and different uppercase letters in the same raw indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

表2 不同体重大豆食心虫幼虫越冬前后在不同土层深度中过冷却点的比较

Table 2 Comparison of supercooling point of *Leguminivora glycinivorella* larvae with different weight before and after overwintering in different soil layers

体重 Weight	过冷却点 Supercooling point (°C)			
	越冬前 Pre-overwintering	越冬后 Overwintering		
		0 cm	3 cm	8 cm
大 Heavy	-14.22±5.08 Aa	-24.62±0.41 Cc	-16.76±4.76 Ba	-14.37±4.98 Aa
中 Medium	-16.30±5.29 Ab	-21.58±0.27 Bb	-16.58±4.82 Aa	-16.43±5.13 Ab
小 Light	-17.63±5.03 Ac	-20.28±2.31 Ba	-17.84±4.61 Ab	-17.64±4.88 Ab

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母、同行不同大写字母分别表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column and different uppercase letters in the same raw indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 大豆食心虫幼虫越冬前后过冷却点比较

越冬前结茧滞育的大豆食心虫大、中、小幼虫过冷却点分别为-14.22、-16.30和-17.63°C,幼虫过冷却点随体重的减小而降低,体重越轻过冷却点越低,过冷却能力越强,并且大、中、小幼虫间过冷却点差异显著(表2)。越冬后不同体重幼虫过冷却点比越冬前均有所下降,其下降幅度与所承受的低温环境压力大小有关,在不同土层深度越冬幼虫所承受低温环境压力不同,其压力变化随土层深度的增加而减小。处于地表的越冬幼虫所承受的低温环境压力最大,其过冷却点最低,大幼虫过冷却点明显低于中、小幼虫;地表越冬的大、中、小幼虫过冷却点与同体重地表下3 cm和8 cm土层的幼虫差异显著。地表下3 cm土层不同体重幼虫过冷却点为: $SCP_{小}<SCP_{大}<SCP_{中}$;地表下8 cm土层幼虫过冷却点稍低于越冬前,差异不显著, $SCP_{小}<SCP_{中}<SCP_{大}$ 。在地表下3 cm和8 cm土层越冬的中、小幼虫过冷却点差异不显著,而大幼虫的过冷却点分别为-16.76°C和-14.37°C,差异显著。

2.4 越冬幼虫过冷却点与小分子内含物的关系

2.4.1 越冬幼虫小分子内含物的相对含量

过冷却点范围不同的A、B、C、D四组大豆食心虫越冬幼虫体内检测到海藻糖、葡萄糖和L-异亮氨酸等10种小分子化合物(表3)。其中,海藻糖相对含量最高,不同组间平均相对含量为60.55%,显著高于其它9种小分子化合物,是其它9种小分子化合物总和的13.18倍;其次是葡萄糖,平均相对含量为1.68%,之后是L-脯氨酸,平均相对含量为0.90%,其

它7种小分子化合物平均相对含量均小于0.50%。4组越冬幼虫均含有海藻糖、葡萄糖、L-脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、L-苏氨酸和琥珀酸这7种化合物。过冷却点最低的D组($SCP < -22^{\circ}\text{C}$)海藻糖和葡萄糖相对含量最高,分别为72.38%和4.80%,显著高于过冷却点最高的A组($-12^{\circ}\text{C} < SCP < -7^{\circ}\text{C}$),但L-异亮氨酸、谷酰胺和瓜氨酸在D组幼虫中未检测到,且L-脯氨酸、丝氨酸、L-苏氨酸和琥珀酸相对含量均低于其它3组幼虫。

表3 大豆食心虫越冬幼虫体内小分子内含物的相对含量

Table 3 Relative amounts of low-molecule-weight compounds in <i>Leguminivora glycinivorella</i> overwintering larvae					%
小分子内含物 Low-molecule-weight compound	A组 Group A ($-7^{\circ}\text{C} \sim -12^{\circ}\text{C}$)	B组 Group B ($-12^{\circ}\text{C} \sim -17^{\circ}\text{C}$)	C组 Group C ($-17^{\circ}\text{C} \sim -22^{\circ}\text{C}$)	D组 Group D ($< -22^{\circ}\text{C}$)	均值 Average
海藻糖 Trehalose	55.50±3.15 b	60.83±3.22 ab	64.35±2.31 a	72.38±4.81 a	60.55±1.51 a
葡萄糖 Glucose	0.75±0.31 b	0.80±0.06 b	0.36±0.05 b	4.80±3.39 a	1.68±0.88 b
L-异亮氨酸 L-isoleucine	0.30±0.07 a	0.16±0.02 b	0.12±0.12 b	0.00±0.00 c	0.15±0.03 c
L-脯氨酸 L-proline	1.64±0.94 a	0.90±0.21 ab	0.69±0.15 ab	0.35±0.04 b	0.90±0.26 bc
甘氨酸 Glycine	0.47±0.19 a	0.37±0.05 a	0.32±0.03 a	0.47±0.05 a	0.41±0.043 c
丝氨酸 Serine	0.67±0.24 a	0.56±0.21 a	0.52±0.17 a	0.14±0.03 b	0.47±0.14 c
L-苏氨酸 L-threonine	0.61±0.06 a	0.26±0.08 b	0.28±0.05 bc	0.13±0.03 c	0.32±0.02 c
琥珀酸 Succinic acid	0.46±0.20 a	0.34±0.03 a	0.35±0.06 a	0.12±0.02 b	0.32±0.07 c
谷酰胺 Glutamine	0.33±0.11 a	0.15±0.03 ab	0.25±0.11 bc	0.00±0.00 c	0.18±0.04 c
瓜氨酸 Citruline	0.84±0.20 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.21±0.05 c

表中数据为平均数±标准差。A、B、C、D组同行不同字母表示不同组间经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 差异显著,均值一列中不同字母表示不同小分子内含物间经Duncan氏新复极差法在 $P < 0.05$ 差异显著。Data in the table are mean±SD. Different letters of A, B, C and D groups indicate significant difference among different groups at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test, different letters of average group indicate significant difference among different low-molecule-weight compounds at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4.2 越冬幼虫过冷却点与小分子内含物的相关性

按不同过冷却点分组的大豆食心虫越冬幼虫体内小分子内含物相对含量与其过冷却点相关性分析结果表明,越冬幼虫体内10种小分子内含物中,葡萄糖和海藻糖相对含量与过冷却点呈负相关,相关系数分别为-0.5393和-0.8479(表4),这表明幼虫体内葡萄糖和海藻糖相对含量越高,其过冷却点越低,过冷却能力越强,耐寒性也越强,这2种化合物具有抗冻保护剂作用。幼虫过冷却点随海藻糖相对含量增加明显降低,呈极显著负相关($P=0.0005$),海藻糖在大豆食心虫越冬过程中起主要的抗冻保护作用。其它8种小分子化合物相对含量与过冷却点呈正相关,其含量越高,幼虫过冷却点也越高,过冷却能力越弱,耐寒性也越弱;并且除甘氨酸外幼虫过冷却点随其它7种氨基酸类化合物相对含量增加而显著升

高,相关系数均超过0.6797。

3 讨论

环境温度的高低与越冬幼虫的存活率密切相关。越冬幼虫耐寒性强弱已成为制约其种群生存、繁衍和扩大分布的重要因素(Bale, 1989),生活在气温相对较低的温带和寒冷地区的昆虫,形成一系列适应低温环境的对策,选择合适越冬场所则是其躲避低温保护自己的一个有效的生态策略。自然状态下大豆食心虫老熟幼虫一般在3~8 cm土层越冬,本试验结果表明,土层覆盖对大豆食心虫越冬幼虫具有保温作用,在适合范围内,土层越深保护作用越强,大豆食心虫越冬幼虫存活率越高。昆虫越冬对土层深度的选择反应了昆虫对低温胁迫的行为避冷策略。这种策略的应用在许多昆虫越冬过程中都有

体现,如黄地老虎 *Agrotis segetum* 会随着冬季地温的降低潜入土壤的深度不断增加以躲避低温伤害(黄国祥等,1990);桃小食心虫 *Carposina sasakii* 在室外土层 3~10 cm 深处自然结茧越冬,未结茧幼虫

则不能顺利越冬(王鹏等,2011)。土壤、昆虫的茧和蛹壳等均是良好的越冬场所,所形成的小环境大大降低了冷却速率,缓冲了极端低温对昆虫的伤害(Sinclair, 1997)。

表 4 大豆食心虫越冬幼虫过冷却点与体内小分子内含物相对含量的相关性
Table 4 Relativity between SCP of *Leguminivora glycinivorella* overwintering larvae
and relative content of low-molecule-weight compounds

小分子内含物 Low-molecule-weight compound	线性回归方程 Regression equation	<i>r</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
海藻糖 trehalose	$y=32.2899-0.8095x$	-0.8479	25.5888	0.0005
葡萄糖 Glucose	$y=-2.0329-0.2218x$	-0.5393	4.1014	0.0704
L-异亮氨酸 L-Isoleucine	$y=0.4546+0.0185x$	0.9311	65.2351	0.0000
L-脯氨酸 L-Proline	$y=-22.6071+6.5751x$	0.7320	11.5436	0.0063
甘氨酸 Glycine	$y=0.4463+0.0022x$	0.1151	0.1342	0.7218
丝氨酸 Serine	$y=0.9900+0.0310x$	0.6970	9.4507	0.0118
L-苏氨酸 L-Threonine	$y=0.7943+0.0283x$	0.8597	28.3168	0.0003
琥珀酸 Succinic acid	$y=0.6365+0.0191x$	0.7199	10.7600	0.0083
谷酰胺 Glutamine	$y=0.4632+0.0169x$	0.6797	8.5914	0.0150
瓜氨酸 Citrulline	$y=1.0754+0.0518x$	0.7737	14.9106	0.0032

当昆虫被迫面对低温胁迫时,其耐寒性具有可塑性(Jakobs et al., 2015),过冷却点会随温度降低而降低,从而减少体液结冰对其造成的伤害,度过寒冬而存活下来。将越冬前结茧滞育的大豆食心虫幼虫置于地表,越冬后其存活率虽然降低,但存活下来的幼虫过冷却点却明显低于深土层的越冬幼虫,其耐寒性显著增强。梁中贵等(2005)对松阿扁叶蜂 *Acantholyda posticalis* 越冬幼虫的研究也发现越冬初期幼虫过冷却点较高,到 12 月越冬期则明显下降,而早春出蛰随着温度的升高过冷却点也随之升高。这种过冷却点随温度呈现出的季节性变化反映了昆虫对自身耐寒性的调节,这种调节还表现在选择适合的状态进入越冬,以某一发育阶段或滞育虫态来越冬(Hirai et al., 2016)。大豆食心虫以滞育幼虫越冬,小幼虫的存活率明显高于大幼虫,存活下来的大幼虫需更大幅度地降低过冷却点才能应对寒冷胁迫。在应对同样低温胁迫时,小幼虫的过冷却能力强于大幼虫,一是由于体内水分的减少降低了过冷却点(Masahiko & Kazuhiro, 1997),其次是肠道内含物少,降低了冰核成核剂的水平,减少了细胞内冰晶的形成,降低了对细胞内部的机械损伤。Andreadis et al. (2013) 和 Neven (1999) 对仓圆柄姬蜂 *Venturia canescens* 和苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的耐寒性研究也发现,昆虫减少取食能够降低过冷却点,增加耐

寒性。由此可见,昆虫的耐寒性是环境和自身多因素复杂作用的结果,过冷却点反应了耐寒能力,但只能作为一个相对抗寒能力指标(Nedved, 2000),在预测与越冬区划分上起指导作用。

越冬期间昆虫除了采取生态策略适应低温环境,虫体内还发生着复杂的生理生化代谢反应,许多物质的含量发生变化,综合作用于昆虫,影响昆虫的耐寒性(Andreadis & Athanassiou, 2017)。本研究检测到大豆食心虫越冬幼虫体内小分子化合物海藻糖相对含量最高,与越冬幼虫过冷却点呈极显著负相关。这与稻黑蝽 *Scotinophara lurida* 成虫和科氏果壳螟 *Arimania comaroffi* 越冬滞育蛹的越冬生理代谢研究结果相符(Cho et al., 2007; Bemani et al., 2012),越冬昆虫过冷却点会随着越冬时间及温度的下降而有所降低,其糖原一部分会转变为海藻糖,虫体内海藻糖含量相应增加,海藻糖的大量积累可稳定蛋白质结构和生物膜活性,增加体液的浓度,与水分子结合,降低过冷却点和结冰点,具有抗冻保护剂的作用(Koštal et al., 2011)。葡萄糖作为昆虫越冬的另外一种抗冻保护剂,在一些昆虫体内含量较高,并呈现季节性变化(Feng et al., 2016),但在大豆食心虫越冬幼虫体内其相对含量明显低于海藻糖,与过冷却点相关性不显著,可能是葡萄糖参与了海藻糖的转化反应,而对提高昆虫的抗寒性作用较小

(Andreadis et al., 2008)。本研究发现大豆食心虫幼虫体内8种氨基酸类化合物相对含量较低,且与越冬幼虫过冷却点呈正相关;而Xu et al. (2015)检测美国白蛾 *Hyphantria cunea* 越冬蛹血淋巴中化学物质发现,丙氨酸、赖氨酸和精氨酸含量比非越冬蛹更高,氨基酸的积累增加了昆虫的抗寒性,但海藻糖含量却在最冷的季节降到最低水平,通过热量示差扫描法研究发现美国白蛾可以通过产生抗冻蛋白提高耐寒性。Košťál et al. (2007)对云杉八齿小蠹 *Ips typographus* 越冬成虫耐寒性研究表明冷冻保护系统的主要成分是葡萄糖、海藻糖、山梨糖醇、甘露醇和赤藓糖醇,次要组分是甘油、果糖、肌醇和核糖醇,各种组分有明显的季节性积累和消耗模式。由此可见,不同昆虫通过调整不同的生物化学物质含量来增加过冷却能力,提高存活率(Ditrich & Košťál, 2011)。这些化学物质以不同的代谢途径积累,并由低温启动(Doucet et al., 2009)。大豆食心虫越冬幼虫体内是否也存在一个冷冻保护系统,冷冻保护系统包括哪些化学物质,这些物质以怎样的动态变化来调节耐寒能力等问题还需要进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Andreadis SS, Athanassiou CG. 2017. A review of insect cold hardiness and its potential in stored product insect control. *Crop Protection*, 91: 93–99
- Andreadis SS, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E, Savopoulou-Soultani M. 2008. Age-dependent changes in tolerance to cold and accumulation of cryoprotectants in overwintering and non-overwintering larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Physiological Entomology*, 33(4): 365–371
- Andreadis SS, Spanoudis CG, Athanassiou CG, Savopoulou-Soultani M. 2013. Factors influencing supercooling capacity of the koinobiont endoparasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Pest Management Science*, 70(5): 814–818
- Bale JS. 1989. Cold hardiness and overwintering of insects. *Agricultural Zoology Reviews*, 3: 157–192
- Bemani M, Izadi H, Mahdian K, Khani A, Samih MA. 2012. Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7): 897–902
- Cho JR, Lee MH, Kim HS, Kim YG, Boo KS. 2007. Cold hardiness in the black rice bug, *Scotinophara lurida*. *Physiological Entomology*, 32(2): 167–174
- Ditrich T, Košťál V. 2011. Comparative analysis of overwintering physiology in nine species of semi-aquatic bugs (Heteroptera: Gerromorpha). *Physiological Entomology*, 36(3): 261–270
- Doucet D, Walker VK, Qin W. 2009. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. *Cellular and Molecular Life Science*, 66(8): 1404–1418
- Feng YQ, Xu LL, Li WB, Xu ZC, Cao M, Wang JL, Tao J, Zong SX. 2016. Seasonal changes in supercooling capacity and major cryoprotectants of overwintering Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) larvae. *Agricultural and Forest Entomology*, 18(3): 302–312
- Hirai N, Hirai Y, Ishii M. 2016. Differences in pupal cold hardiness and larval food consumption between overwintering and non-overwintering generations of the common yellow swallowtail, *Papilio machaon* (Lepidoptera: Papilionidae), from the Osaka population. *Entomological Science*, 19(3): 180–187
- Hu ZF, Zhang TS, Xing Y, Zhang TJ, Dong H, Cong B. 2016. Cold hardiness dynamics of overwintering *Ostrinia furnacalis* larvae in northeastern China. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 722–730 (in Chinese) [胡志凤, 张统书, 邢月, 张天竞, 董辉, 丛斌. 2016. 东北地区亚洲玉米螟越冬幼虫抗寒性时间动态. *植物保护学报*, 43(5): 722–730]
- Huang GX, Wang YC, You ZP. 1990. Studies on cold tolerance functions of *Agrotis segetum*. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 7(2): 140–146 (in Chinese) [黄国祥, 王荫长, 尤子平. 1990. 黄地老虎耐寒机制初探. *浙江林学院学报*, 7(2): 140–146]
- Jakobs R, Gariepy TD, Sinclair BJ. 2015. Adult plasticity of cold tolerance in a continental-temperate population of *Drosophila suzukii*. *Journal of Insect Physiology*, 79(8): 1–9
- Jing XH, Kang L. 2002. Research progress in insect cold hardiness. *Acta Ecologica Sinica*, 22(12): 2202–2207 (in Chinese) [景晓红, 康乐. 2002. 昆虫耐寒性研究. *生态学报*, 22(12): 2202–2207]
- Košťál V, Doležal P, Rozsypal J, Moravcová M, Zahradníčková H, Šimek P. 2011. Physiological and biochemical analysis of overwintering and cold tolerance in two central European populations of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology*, 57(8): 1136–1146
- Košťál V, Zahradníčková H, Šimek P, Zelený J. 2007. Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology*, 53(6): 580–586
- Liang ZG, Xu YY, Sun XG, Zhang TX, Zhang WG, Xu YX. 2005. The cold hardiness of overwintering larvae of *Acantholyda posticalis* Matsumura (Hymenoptera: Pamphiliidae) in Tai'an. *Acta Ecologica Sinica*, 25(12): 3259–3263 (in Chinese) [梁中贵, 许永玉, 孙绪良, 张同心, 张卫光, 徐延熙. 2005. 泰安地区松阿扁叶蜂越冬幼虫抗寒性. *生态学报*, 25(12): 3259–3263]
- Liu ZD, Gong PY, Wu KJ, Wei W, Li DM. 2007. Effects of larval host plants on overwintering preparedness and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 53(10): 1016–1026
- Masahiko W, Kazuhiro T. 1997. Overwintering status and cold hardiness of *Hypera punctata* (Coleoptera: Curculionidae). *Cryobiology*, 35(3): 270–276
- Nedved O. 2000. Snow white and the seven dwarfs: a multivariate approach to classification of cold tolerance. *Cryo Letters*, 21(6): 305–312

- 339–348
- Neven LG. 1999. Cold hardiness adaptations of codling moth, *Cydia pomonella*. *Cryobiology*, 38(38): 43–50
- Ouyang F, Ge F. 2014. Methodology of measuring and analyzing insect cold hardiness. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1646–1652 (in Chinese) [欧阳芳, 戈峰. 2014. 昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法. *应用昆虫学报*, 51(6): 1646–1652]
- Park YJ, Kim YG. 2014. A specific glycerol kinase induces rapid cold hardening of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Physiology*, 67(4): 56–63
- Qin HD, Gao Y, Xu W, Cui J, Shi SS. 2015. Effect of soil humidity on overwintering behavior of soybean pod borer (*Leguminivora glycinivorella*) larvae. *Soybean Science*, 34(6): 1024–1028 (in Chinese) [秦昊东, 高宇, 徐伟, 崔娟, 史树森. 2015. 土壤湿度对大豆食心虫幼虫越冬行为影响. *大豆科学*, 34(6): 1024–1028]
- Shi SS. 2013. Theories and technology of integrated pests control in soybean. Changchun: Jilin Publishing Group Company Limited, pp. 199–204 (in Chinese) [史树森. 2013. 大豆害虫综合防控理论与技术. 长春: 吉林出版集团有限责任公司, pp. 199–204]
- Sinclair BJ. 1997. Seasonal variation in freezing tolerance of the New Zealand alpine cockroach *Celatoblatta quinque-maculata*. *Ecological Entomology*, 22(4): 462–467
- Somme L, Zachariassen KE. 1981. Adaptations to low temperature in high altitude insects from Mount Kenya. *Ecological Entomology*, 6(2): 199–204
- Storey KB, Storey JM. 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews*, 68(1): 27–84
- Wang P, Yu Y, Men XY, Zhang SC, Zhang AS, Xu YY, Li LL. 2011. Dynamics of cold-resistant substances in overwintering cocooned and non-cocooned larvae of the peach fruit moth, *Carposina niponensis* Walsingham (Lepidoptera: Carposinidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 279–285 (in Chinese) [王鹏, 于毅, 门兴元, 张思聪, 张安盛, 许永玉, 李丽莉. 2011. 越冬过程中桃小食心虫结茧和裸露幼虫体内耐寒性物质动态变化. *昆虫学报*, 54(3): 279–285]
- Watanabe M, Tanaka K. 1998. Adult diapause and cold hardiness in *Aulacophora nigripennis*. *Journal of Insect Physiology*, 44(11): 1103–1110
- Xu QF, Guo SG, Han YM, Feng Z, Zhang R, Li YZ. 1965. A study on the soybean pod borer (*Leguminivora glycinivorella*) (Mats.) Obraztsov. *Acta Entomologica Sinica*, 14(5): 461–479 (in Chinese) [徐庆丰, 郭守桂, 韩玉梅, 冯真, 张荣, 李义忠. 1965. 大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* (Mats.) Obraztsov 的研究. *昆虫学报*, 14(5): 461–479]
- Xu XR, Zhu MM, Li LL, Zhang GC, Zheng Y, Li T, Sun SH. 2015. Cold hardiness characteristic of the overwintering pupae of fall webworm *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) in the northeast of China. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(1): 39–45
- Yi JQ, Zhang GR, Guo CL, Min Q, Zou ZW. 2015. Relationship between hemolymph composition and cold tolerance in *Thitarodes pui* larvae. *Acta Ecologica Sinica*, 35(18): 6208–6215 (in Chinese) [易杰群, 张古忍, 郭晨林, 闵强, 邹志文. 2015. 蒲氏钩蝠蛾幼虫血淋巴物质与其耐寒性. *生态学报*, 35(18): 6208–6215]
- Zhang HG, Lu X, He KL, Wang ZY. 2010. Cold hardiness and the strategies of *Ostrinia furnacalis* survival at supercooled temperature. *Journal of Plant Protection*, 37(5): 398–402 (in Chinese) [张洪刚, 鲁新, 何康来, 王振营. 2010. 亚洲玉米螟抗寒及低温生存对策. *植物保护学报*, 37(5): 398–402]

(责任编辑:李美娟)