

冷驯化对油松毛虫越冬幼虫过冷却点及主要耐寒物质的影响*

邵钰莹^{1**} 冯宇倩² 田 斌¹ 宗世祥^{1***}

(1. 北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083;

2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所森林病原整合生物学研究室, 北京 100091)

摘 要 【目的】 冷驯化可增强昆虫的耐寒性, 本文研究旨在明确不同冷驯化条件下油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu 越冬幼虫的过冷却点和主要耐寒物质的变化规律。**【方法】** 利用热电偶方法测定越冬幼虫的过冷却点, 分别采用差量法、氯仿甲醇法、苯酚硫酸法及毛细管气相色谱法测定其含水率、脂肪、糖原和小分子糖醇的含量。**【结果】** 冷驯化会导致幼虫含水率显著降低; 过冷却点和脂肪含量在低于环境气温 5℃冷驯化后显著降低, 当驯化温度低于环境气温 10℃及以上则升高; 糖原含量在 9 月份显著增加, 越冬中期 (1、3 月份) 含量略有降低但不显著; 小分子糖醇含量的变化均不显著; 海藻糖含量略降低; 甘油、葡萄糖和半乳糖含量在低于环境气温 5℃冷驯化后略降低, 低于环境气温 10℃冷驯化则升高。**【结论】** 冷驯化使幼虫虫体含水率和脂肪含量降低, 糖原含量提高, 从而导致其过冷却点降低, 耐寒能力提高; 冷驯化的温度和时间均会影响其过冷却能力, 在最适合的温度和时长可以最大程度提高其耐寒能力。研究结果为揭示油松毛幼虫的耐寒机制及潜在分布区预测提供了科学依据。

关键词 油松毛虫, 幼虫, 不同越冬阶段, 冷驯化, 过冷却点, 耐寒物质

Effects of cold acclimation on the supercooling point and major cold hardiness chemicals of overwintering *Dendrolimus tabulaeformis* larvae

SHAO Yu-Ying^{1**} FENG Yu-Qian² TIAN Bin¹ ZONG Shi-Xiang^{1***}

(1. Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Laboratory of Forest Pathogen Integrated Biology Science, Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract 【Objectives】 To explore the effects of cold acclimation on the cold hardiness of overwintering *Dendrolimus tabulaeformis* larvae. **【Methods】** Changes in supercooling point and major cold hardiness chemicals were measured. A thermocouple was used to measure supercooling points. Moisture, lipid, glycogen and small molecule sugar and alcohol content of larvae were determined using the delta rule, the chloroform-methanol method, phenol-sulfuric acid method and capillary gas chromatography, respectively. **【Results】** The moisture content, supercooling point and lipid content of *D. tabulaeformis* larvae acclimated to within 5℃ below ambient temperature declined significantly, but increased in larvae acclimated to within 10℃ below ambient temperature. Glycogen content significantly increased in September, but decreased slightly in January and March after cold acclimation. Changes in small molecular sugar and alcohol content were not significant. Trehalose content slightly decreased and glycerol, glucose and galactose decreased in larvae acclimated to within 5℃ below ambient temperature, but increased when larvae were acclimated to temperatures 10℃ below ambient temperature. **【Conclusion】** The observed changes in moisture, lipid, glycogen content and small molecular sugar and alcohols suggest that cold acclimation can increase the cold hardiness of *D. tabulaeformis*. The supercooling ability of *D. tabulaeformis* appears to

*资助项目 Supported projects: 公益性行业科研专项: 重大森林虫灾监测预警的关键技术研究 (201404401)

**第一作者 First author, E-mail: 1102671261@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zongsx@126.com

收稿日期 Received: 2017-09-28, 接受日期 Accepted: 2017-11-01

be affected by both temperature and the time of cold acclimation, which suggests that there are optimal acclimation conditions that can maximize cold hardiness. These results provide a theoretical basis for revealing the cold hardiness mechanism and potential distribution of *D. tabulaeformis*.

Key words *Dendrolimus tabulaeformis*, overwintering periods, larvae, cold acclimation, supercooling point, cold hardiness substances

昆虫是变温动物,其体温会随着温度变化而变化。温度是昆虫生活史影响因素中最为显著的一个因子,直接影响昆虫的生长、发育、繁殖及分布。随着全球气候变暖,温度的普遍升高促使很多温寒带昆虫种群数量大增(Harrington *et al.*, 2001)。然而,温度升高的同时,局部地区气候异常现象频繁发生,异常低温的出现也给昆虫的生存带来了严峻的挑战。低温是影响昆虫生长发育的关键作用因子,严格制约昆虫种群的延续,因此昆虫耐寒性的高低是其种群存活和扩散的重要前提(景晓红和康乐, 2002)。昆虫的耐寒性可以通过昆虫的过冷却点来体现,与虫体水分、脂肪、糖原以及部分小分子糖醇等耐寒物质的变化密切相关(Lee, 1991; Storey and Storey, 1991; 孙绪良等, 2001; 景晓红和康乐, 2002, 2004; 陈豪等, 2010)。

冷驯化作为昆虫的一种重要的耐寒性策略,能够影响昆虫的越冬期间耐寒性相关的指标及生理生化物质,增强昆虫的耐寒性。冷驯化会导致红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 的过冷却点降低,虫体水分含量下降,脂肪、甘油和糖类含量出现不同程度的上升(万婕等, 2014);对广聚萤叶甲 *Ophraella communa* 实验虫体自由水和总糖含量的影响并不显著,但甘油含量、过氧化氢酶和过氧化物酶活性都呈现先上升后下降的曲线变化(岳雷等, 2014);增加实验蠋蛾 *Arma chinensis* 体内葡萄糖、海藻糖等与耐寒性相关的小分子糖醇的含量(李兴鹏等, 2012);提高茶尺蠖 *Ectropis oblique* 的耐寒性,是虫体内的水分、脂肪、糖原、蛋白质等含量以及抗逆酶活性变化的综合反映(段小凤等, 2015)。大多数昆虫对于低温的耐受限度都是可以调节的,因此,利用冷驯化可以使昆虫在环境气温变化的过程中产生积极地响应,从而提高自身耐寒性来抵御低温的胁迫(赵静, 2008; 段小凤等, 2015)。

油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai *et Liu*, 属鳞翅目 Lepidoptera, 枯叶蛾科 Lasiocampidae, 是我国 6 种频繁暴发的松毛虫之一,也是我国北方针叶林重要的食叶害虫(刘友樵, 1963; 曾菊平等, 2010; 李燕, 2013)。关于油松毛虫的研究主要集中于生物生态学特性、灾害监测和综合防控技术等方面(汤文高, 2012; 朱程浩, 2016; 白雪琪, 2016)。有关油松毛虫幼虫耐寒性的研究还少有报道。夏瑞心和徐丽华(1993)曾对油松毛虫越冬幼虫的耐寒性进行研究,认为在油松毛虫幼虫入蛰期和出蛰期,温差变化较大容易导致死亡率升高,根据测得的过冷却点及冰点的数据,推测越冬期气温低于 -22°C , 油松毛虫的死亡率将大于 90%。有关低温对油松毛虫幼虫耐寒性影响的研究发现,暴露温度越低,存活时间越短, 0°C 低温驯化可以明显提高其耐寒性(张丽丽, 2005)。由此可以推测油松毛虫幼虫的低温耐受能力有较强的可塑性,环境条件适宜,也有可能进一步向北方扩散。但是,对于油松毛虫冷驯化的内在生理机制以及影响因素目前尚未了解清楚。

本文通过对越冬期的油松毛虫幼虫进行长期不同强度的冷驯化实验,测定冷驯化后过冷却点、含水率、脂肪、糖原和小分子糖醇等耐寒性物质的含量,来探究冷驯化对其过冷却点和耐寒性物质的影响,为明确油松毛虫越冬幼虫冷驯化的生理代谢机制以及与耐寒性的关系,为有效防控油松毛虫提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源

油松毛虫幼虫采集于辽宁建平人工油松林。采集时间由 2014 年 9 月至 2015 年 5 月,每隔两个月采集一次,共采集 5 次。具体采集日期:

2014-9-23, 2014-11-9, 2015-1-10, 2015-3-15, 2015-5-11, 采集量 300~500 头/次。采集时, 将幼虫装入有大量油松枝叶的塑料桶内, 为保证其呼吸通畅, 以两层纱布封口带回。

所有环境温度数据均通过中国气象科学数据共享网获得 (<http://www.cma.gov.cn/>)。

1.2 测定方法

1.2.1 冷驯化实验梯度 每 5°C 或 10°C 为一个梯度进行冷驯化, 每个月份采集的幼虫经受的具体温度梯度设置如表 1。每个处理 30~40 头幼虫, 驯化时间为 55 h、120 h。设置空白对照组 (CK 组), 即采集后未经任何处理的幼虫 30~40 头。对驯化组和 CK 组的油松毛虫越冬幼虫进行过冷却点、含水率以及糖原、脂肪和小分子糖醇含量的测定。

表 1 冷驯化实验梯度
Table 1 Test gradient of cold acclimation

温度 Temperature	月份 Month				
	2014-9	2014-11	2015-1	2015-3	2015-5
0°C	55 h	120 h			120 h
- 5°C		120 h		120 h	120 h
- 10°C		120 h	120 h	120 h	
- 15°C			120 h		

1.2.2 过冷却点 采用“热电偶-高低温实验箱-过冷却点数据记录仪”连接设备测定幼虫的过冷却点。使用密封膜将幼虫与热电偶的探针结合, 用吸收棉包围一个带有幼虫的热电偶, 以确保幼体的体温以均匀的速度下降。然后将幼虫置于高低温实验箱 (GDW-100; YaShiLin, 中国北京) 中, 以 1°C/min 的速率冷却至 - 30°C。通过数据记录仪 (uR100, 4152 型, 横河电机株式会社, 韩国首尔) 描述每个幼体体温的变化曲线, 并显示在计算机上。幼体体温随冷冻机内部温度的降低而不断下降, 温度下降到冰点后, 体液开始结晶散发潜热, 幼虫的体温会突然增加, 潜热释放完后幼虫的体温逐渐下降为环境温度。幼虫的过冷却点是体温升高后再次降低的转折点温度。通过电脑的过冷却点测定软件将过冷却点读出, 同时得到整个降温过程幼虫体温变化曲线图。每组

重复测定 30~40 头健康幼虫。

1.2.3 含水率 用分析天平 (AB204-S, METTLER TOLEDO, 精度: 0.000 1 g) 测定单头幼虫鲜重 (FM), 重复测定 30~40 头健康幼虫。将测量 FM 后, 将幼虫单头放入 2 mL 或 5 mL 指形管中, 预先用电烙铁在管壁上穿洞。然后将指形管置于烘箱中, 在 60°C 下干燥 48 h 以获得恒定质量, 即干质量 (DM)。以烘干前后幼虫体重的减轻量作为幼虫的含水率, 含水率 (%) = (FM-DM) / FM × 100。

1.2.4 脂肪含量 采用氯仿甲醇法测定每头幼虫的脂肪含量 (Folch *et al.*, 1957)。单个虫体作为一个样本, 每组测定 10 头幼虫。幼虫称量鲜重 (FM) 后, 将烘干至恒重的幼虫置于 2 mL 或 5 mL 指形管中称干重 (DW), 用研磨棒将其研磨成粉末, 加入 4 mL 的氯仿-甲醇混合液混匀, 2 600 × g 离心 10 min, 移除上清液, 重复以上过程。将含有剩余物质的指形管放入烘箱中, 60°C 下 48 h 烘干至恒重 (LDW)。根据 FM, DM 和 LDM 计算得到脂肪含量: (DW-LDW)/FM × 100。

1.2.5 糖原含量 采用苯酚硫酸法测定每头幼虫的糖原含量 (Ouyang *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2016)。单个幼虫作为一个样本, 每组测定 5~10 头幼虫。每个幼虫放在 2 mL 或 5 mL 指形管中烘干称重 (DW) 后, 加入 2 mL 70% (v/v) 的乙醇 (含有 10 μL 内标的赤藓糖) 研磨匀浆, 并以 2 600 × g 离心 10 min。除去上清液, 重复该过程两次 (Liu *et al.*, 2007) 加入 2 mL 10% (v/v) 三氯乙酸后, 将混合物加热至 80°C 15 min, 冷却并以 2 600 × g 离心 10 min。取 0.5 mL 上清液与 0.5 mL 苯酚硫酸 (5%) 和 2.5 mL 浓硫酸混合。静置 10 min 后摇匀, 在 75°C 下加热 20 min, 冷却并稀释至 15 mL。使用紫外 (UV) 可见分光光度计 (TU-1810; Puxin, 北京, 中国), 在 490 nm 处读取吸光度。制作糖原标准样品, 并用分光光度计测定标准糖原曲线 (林炜, 2008)。通过与糖原标准曲线进行比较来确定未知样品中糖原的含量。

1.2.6 小分子糖醇 采用毛细管气相色谱法测定小分子糖醇小分子糖醇物质含量。每组测定

10 头幼虫, 将烘干后的幼虫在离心管中研磨粉碎后, 用 0.4 mL 的 70% (v/v) 乙醇 (含有 10 μ L 的赤藓糖作为内标) 匀浆, 10 000 $\times$ g 下离心 5 min。提取上清液, 在氮吹仪下吹干。在剩余物中加入 1 mL 吡啶使之溶解, 在冰水浴中加入六甲基二硅胺烷和三甲基氯硅烷到混合液, 保持 30 min, 完成甲基硅烷化。提取上清液, 10 000 g 离心 5 min, 取 1 mL 的上清液置于棕色气相进样瓶中, 放在色谱仪 (安捷伦 GC 7890) 上, 设置其程序进行分析。与标准样品的峰面积对比得到小分子糖醇的物质的成分以及各成分的浓度。

1.3 数据处理方法

利用 SPSS18.0 统计软件中的 One-way ANOVA 进行单因素方差分析, 采用 LSD 法进行多重比较, 将处理后所得结果数据作图后再进行分析。

2 结果与分析

2.1 环境温度

油松毛虫幼虫越冬期间环境气温的季节性动态变化如图 1 所示: 月平均气温由 17.5 $^{\circ}$ C (9 月) 逐渐下降至 -9.5 $^{\circ}$ C (1 月), 然后逐渐回升到 18.0 $^{\circ}$ C (5 月)。月平均最低气温最低达 -14.9 $^{\circ}$ C (1 月)。各月极端最低气温除 9 月 (0.3 $^{\circ}$ C) 以外, 都为零下, 1 月极端最低气温达到 -27.9 $^{\circ}$ C。

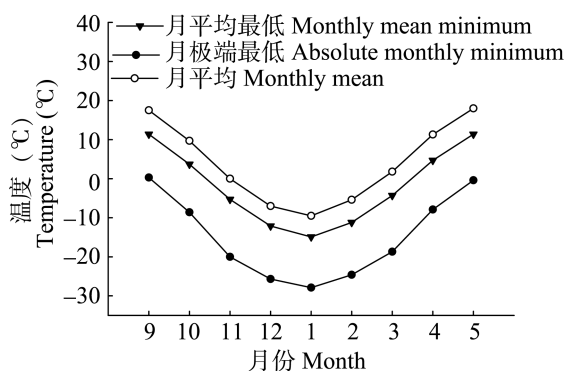


图 1 油松毛虫采集地平均气温、平均最低气温以及极端最低气温的季节性动态变化

Fig. 1 Seasonal changes of monthly mean temperature ($^{\circ}$ C), absolute monthly minimum temperature ($^{\circ}$ C) and monthly mean minimum temperature ($^{\circ}$ C) in sampling location of *Dendrolimus tabularformis* larvae

2.2 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫过冷却点以及生理生化物质的影响

2.2.1 冷驯化对越冬幼虫过冷却点的影响 不同驯化温度下油松毛虫越冬幼虫过冷却点的变化如图 2 所示 9 月份 ($F=4.884$; $df=1, 63$; $P<0.05$) 幼虫的过冷却点显著降低。11 月冷驯化前后过冷却点差异不明显, 呈现先降低后略升高的趋势, 5 $^{\circ}$ C 时最低为 -16.8 $^{\circ}$ C。1 月份 ($F=9.911$; $df=2, 71$; $P<0.01$) 幼虫的过冷却点存在显著差异, -10 $^{\circ}$ C 冷驯化后过冷却点显著降低, -15 $^{\circ}$ C 冷驯化作用不大。3 月份 ($F=4.041$; $df=2, 123$; $P<0.05$) 幼虫的过冷却点显著降低。5 月份 ($F=4.041$; $df=2, 123$; $P<0.05$) 幼虫的过冷却点存在显著差异, 0 $^{\circ}$ C 幼虫的过冷却点显著降低, 而 -15 $^{\circ}$ C 冷驯化后与 CK 组差异不显著。

总体来看, 冷驯化对越冬幼虫的过冷却点有显著影响, 驯化温度在低于环境气温 5 $^{\circ}$ C 范围内, 幼虫体内的过冷却点出现降低的变化, 幼虫的耐寒性增强; 驯化温度低于环境气温 10 $^{\circ}$ C 及以上时, 驯化作用不明显, 幼虫的过冷却点与 CK 组相比变化不大。

2.2.2 冷驯化对越冬幼虫含水率的影响 不同驯化温度下油松毛虫越冬幼虫虫体含水率的变化如图 3 所示: 9 月份 ($F=30.340$; $df=1, 64$; $P<0.01$) 幼虫虫体含水率显著降低了 5.8%。11 月份 ($F=4.041$; $df=2, 123$; $P<0.05$) -5 $^{\circ}$ C 和 -10 $^{\circ}$ C 驯化组幼虫虫体含水率显著降低。1 月份 ($F=4.221$; $df=2, 75$; $P<0.05$) -15 $^{\circ}$ C 驯化组显著降低。3 月份 ($F=4.041$; $df=2, 123$; $P<0.05$) 幼虫虫体含水率显著升高。5 月份 ($F=4.041$; $df=2, 123$; $P<0.05$) -5 $^{\circ}$ C 驯化组显著降低。总体来看, 冷驯化会对幼虫体内含水率产生显著影响, 温度降低会使幼虫体内的含水率下降。

2.2.3 冷驯化对越冬幼虫脂肪含量的影响 不同驯化温度下油松毛虫越冬幼虫虫体脂肪含量的变化如图 4 所示, 9 月份 ($F=8.374$; $df=1, 18$; $P<0.05$) 幼虫的脂肪含量显著降低。11 月份 ($F=3.604$; $df=3, 39$; $P<0.05$) 幼虫的脂肪含量存在显著差异, 0 $^{\circ}$ C、-5 $^{\circ}$ C 驯化组脂肪含量显著降低, 而 -10 $^{\circ}$ C 驯化组与 CK 组差异不显著。

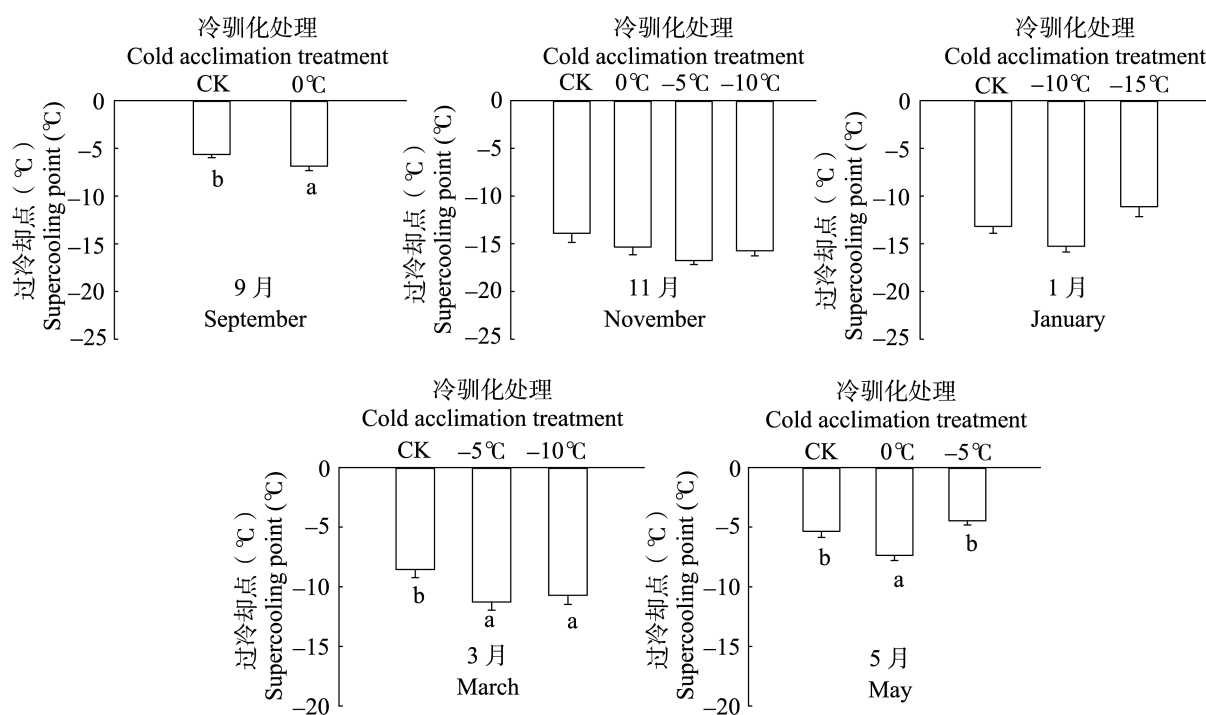


图2 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫过冷却点的影响

Fig. 2 Effects of cold acclimation on supercooling points of *Dendrolimus tabularformis* overwintering larvae

图上标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$. The same below.

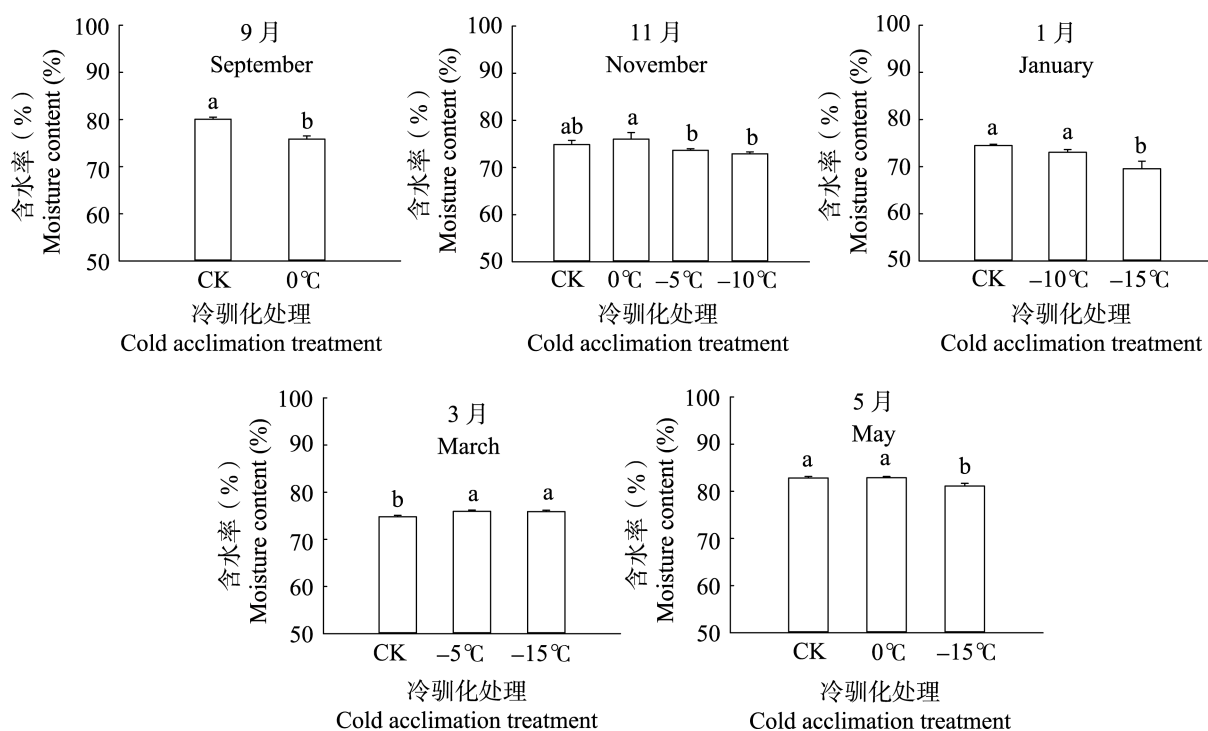


图3 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫虫体含水率的影响

Fig. 3 Effects of cold acclimation on moisture content of *Dendrolimus tabularformis* overwintering larvae

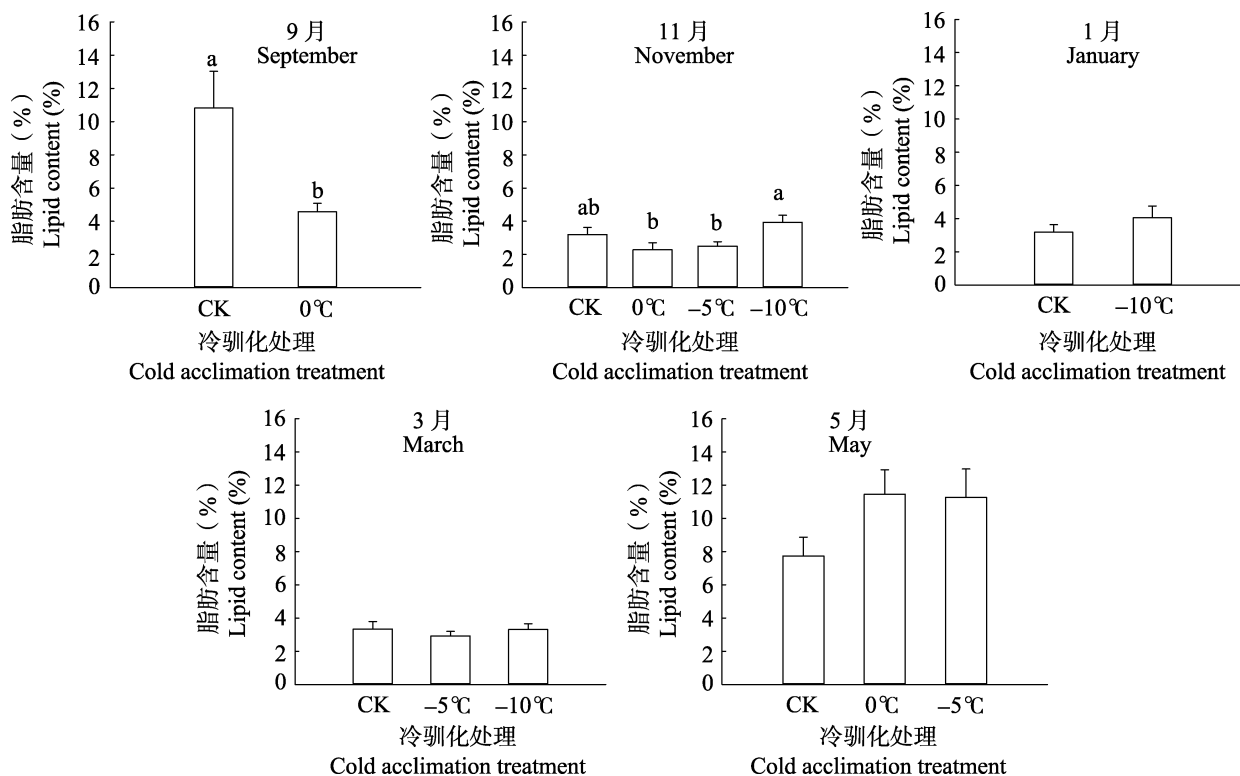


图4 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫虫体脂肪含量的影响

Fig. 4 Effects of cold acclimation on lipid content of *Dendrolimus tabularformis* overwintering larvae

1月、3月和5月幼虫的脂肪含量冷驯化后差异不显著。1月和5月冷驯化组脂肪含量略有升高。

总体来看,冷驯化对越冬前期(9月、11月)幼虫体内脂肪含量影响显著,冷驯化对越冬中后期(1月、3月、5月)幼虫体内脂肪含量影响不显著。驯化温度在低于环境气温5℃范围内,幼虫体内的脂肪含量出现降低的趋势;温度降低至与环境气温相差10℃以上时则出现升高的变化。

2.2.4 冷驯化对越冬幼虫糖原含量的影响 不同驯化温度下油松毛虫越冬幼虫虫体糖原含量的变化如图5所示:9月份($F=5.428$; $df=1, 19$; $P<0.05$)幼虫的糖原含量显著升高至24.46%。11月、1月、3月和5月幼虫的糖原含量冷驯化前后差异不显著。11月和5月驯化组糖原含量略有增加,1月和3月略降低。总体来看,冷驯化对越冬前期(9月)幼虫体内糖原含量影响显著,温度降低会导致糖原含量的增加;冷驯化对越冬中后期(11—5月)幼虫体内糖原含量影响不显著。

2.2.5 冷驯化对越冬幼虫小分子糖醇含量的影响 不同驯化温度下油松毛虫越冬幼虫虫体小分子糖醇含量的变化如图6所示:冷驯化对越冬幼虫体内的小分子糖醇(甘油、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖)的含量无显著影响。9月份驯化组的半乳糖和甘油含量均有所下降,其他小分子糖醇含量变化不大。11月份驯化组的海藻糖含量明显下降,甘油、半乳糖、葡萄糖、甘露糖含量在0℃和-5℃条件驯化后都略降低,-10℃驯化组与CK组相比差别不大。1月份驯化组甘油、半乳糖和海藻糖含量降低,葡萄糖和甘露糖含量略升高。3月份-5℃驯化组的甘油、半乳糖、葡萄糖和甘露糖含量降低;-10℃驯化组海藻糖含量升高。5月份驯化组甘油含量降低,半乳糖含量升高。

总体来看,冷驯化会导致甘油、葡萄糖、半乳糖和海藻糖含量变化较大,甘露糖含量变化较小。驯化温度在低于环境气温5℃范围内,幼虫体内的甘油、葡萄糖和半乳糖含量出现降低的趋势;温度降低至与环境气温相差10℃以上时则

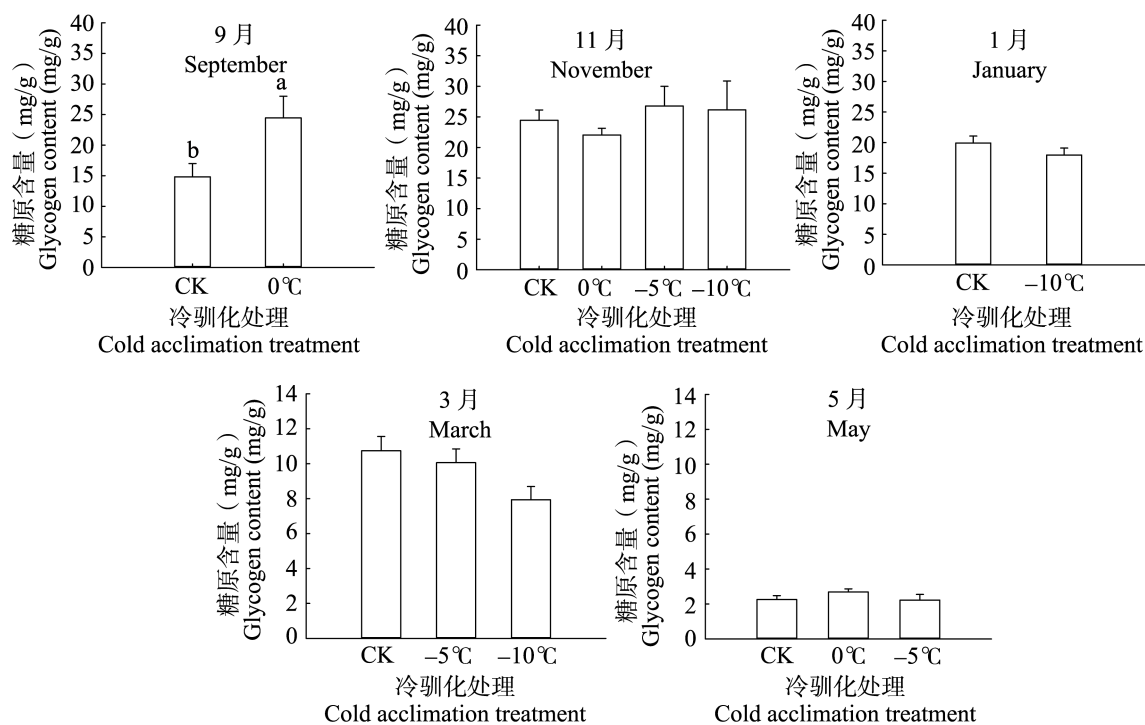


图 5 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫虫体糖原含量的影响

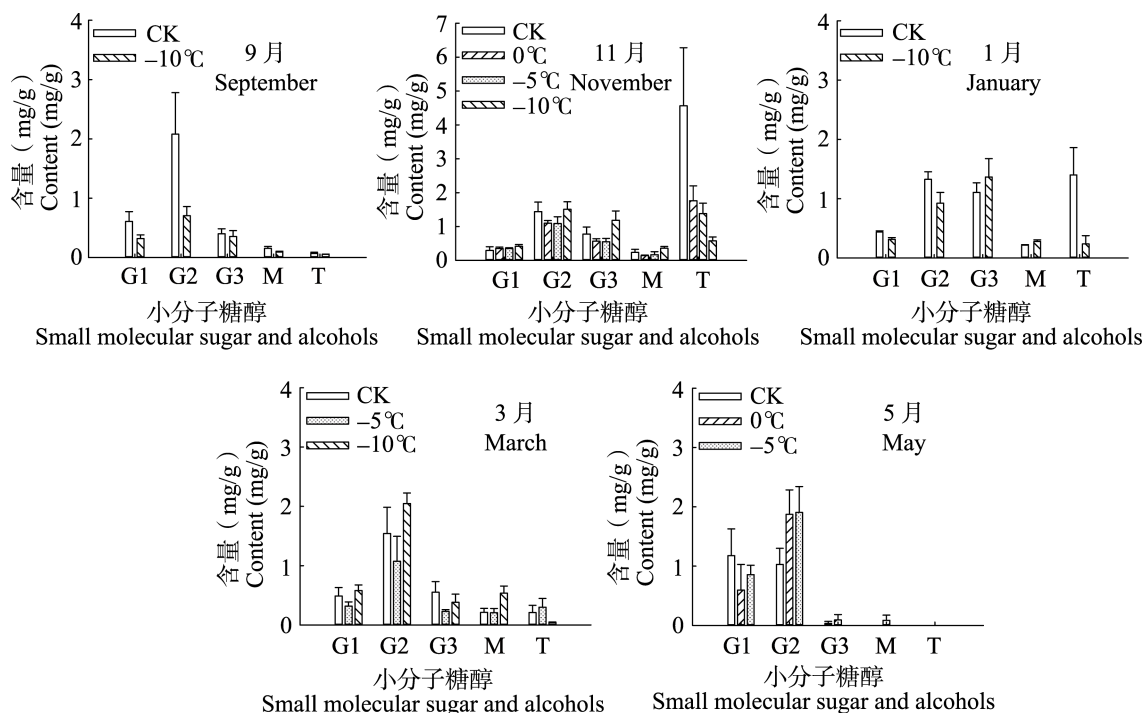
Fig. 5 Effects of cold acclimation on glycogen content of *Dendrolimus tabularformis* overwintering larvae

图 6 冷驯化对油松毛虫越冬幼虫虫体小分子糖醇含量的影响

Fig. 6 Effects of cold acclimation on the content of small molecular sugar and alcohols of *Dendrolimus tabularformis* overwintering larvae

G1: 甘油; G2: 半乳糖; G3: 葡萄糖; M: 甘露糖; T: 海藻糖。

G1: Glycerol; G2: Galactose; G3: Glucose; M: Mannose; T: Trehalose.

均出现升高的变化。冷驯化会导致幼虫体内海藻糖含量出现降低的变化。

3 结论与讨论

3.1 冷驯化对油松毛虫幼虫过冷却点的影响

越冬期间,耐寒性昆虫可以通过调整体液的浓度和体积,生成同源冰核或排出异源冰核,获得较强的过冷却能力,避免结冰遭受冻害而死亡(孙绪良等, 2001; 景晓红和康乐, 2002)。因此,对大多数昆虫来说,过冷却点的高低一定程度上可以反应昆虫耐寒性的强弱(Bale, 1996; 孙绪良等, 2001; 景晓红和康乐, 2002)。CK组的实验结果表明,越冬期不断降低的环境温度对油松毛虫越冬幼虫有驯化作用,可以促使其过冷却点不断降低,提高其耐寒性来避免低温冻害(Danks, 1987)。本实验中,冷驯化后油松毛虫越冬幼虫的过冷却点显著降低,11月份最低达到 -16.76°C ,可见,冷驯化可以显著提高昆虫的过冷却能力,增强其耐寒性,这与段小凤等(2015)对茶尺蠖的冷驯化研究结果相同(Lee, 1989; Koveos, 2001)。冬季的低温以及冷驯化实验都能够使油松毛虫越冬幼虫的过冷却点显著降低,表明其过冷却能力是可以驯化的,耐寒性的可塑性使其能抵御低温的胁迫,避免体液结冰而存活(赵静, 2008; 岳雷, 2014)。对不同强度冷驯化的幼虫过冷却点和脂肪、甘油、葡萄糖和半乳糖含量的测定分析,我们发现, -5°C 低温驯化5d的越冬幼虫的过冷却能力高于 -10°C 低温驯化5d的越冬幼虫,具有更强的耐寒性。可见,冷驯化的温度和时间均会影响油松毛虫越冬幼虫的过冷却能力,而且冷驯化存在最适合的温度和时长,可以最大程度提高其耐寒性。研究表明,某些昆虫也存在有效驯化温度,比如橄榄果蝇 *Bactrocera oleae* 成虫的冷驯化诱导温度为 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的冷驯化诱导温度只在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 范围内才有效(Czajka and Lee, 1990; Koveos, 2001)。

3.2 冷驯化对油松毛虫幼虫体内生理生化物质的影响

昆虫的耐寒性的增强与体内一系列的复杂

的生理生化反应有关,低温诱导可以促进抗冻物质(小分子代谢物质以及抗冻蛋白)的形成并使昆虫体内含水率、糖原、脂肪以及小分子糖醇的含量发生明显的变化(Zachariassen, 1985; Chen *et al.*, 1987; Lee, 1991; Storey and Storey, 1991; Michaud and Denlinger, 2007; Saeidi *et al.*, 2012; 冯宇倩等, 2014; Ouyang and Ge, 2014)。本实验中,冷驯化会使油松毛虫越冬幼虫体内的含水率显著降低,含水率的降低可能会诱导抗冻物质的合成,促进昆虫体液浓度升高,从而提高过冷却能力,进一步增强昆虫的耐寒性避免结冰遭受冻害而死亡(冯玉香和何维勋, 1994)。此外,昆虫体内含水量的降低,昆虫体内的连续较大的水相被一些组织或高浓度物质分离,体液浓度增加从而有利于维持其过冷却状态(韩召军等, 1989; 孙绪良等, 2001; 冯宇倩等, 2014)。冷驯化对越冬前期的油松毛虫幼虫体内的脂肪含量影响较大,在低于环境气温 5°C 范围内的冷驯化会导致脂肪含量的下降,而温度降低至 10°C 及以上,会导致相反的变化。这与上文提到的有效驯化温度导致过冷却点的变化呈现一致性。脂肪的显著下降,可能与遭受低温胁迫后能量消耗有关,此外,脂肪也可以转化为游离脂质、甘油或游离脂肪酸从而提高昆虫的耐寒性(陈永杰等, 2005)。冷驯化对油松毛虫越冬幼虫体内糖原含量也产生影响,越冬前期(9、11月份)冷驯化会导致幼虫体内糖原含量增加。研究表明,糖原作为昆虫体内主要的储能物质,受到低温诱导而积累增加,为越冬期间较强的低温胁迫做准备(Behrooz *et al.*, 2012)。越冬中期(1、3月份),冷驯化导致糖原含量略有下降,这可能与昆虫长时间抵抗寒冷导致的代谢途径改变有关;越冬期间,糖原大部分可以转化为有抗冻作用的多元醇或糖(海藻糖),小部分继续用作功能物质(孙绪良等, 2001; 冯宇倩等, 2014; Andreadis and Athanassiou, 2017)。面对冬季低温胁迫,许多昆虫也进化出一种多组分的抗冻保护系统,主要包括山梨醇,葡萄糖,甘油,甘露糖和海藻糖等小分子糖醇(Sømme, 1982; Han *et al.*, 2005)。本实验研究发现,冷驯化油松毛虫越冬幼虫体内

的小分子糖醇的含量影响都不显著,可能是因为驯化时间过长,幼虫体内的耐寒调节转化为能量消耗。相对比而言,幼虫体内的海藻糖含量减少,而甘油、葡萄糖和半乳糖的含量在低于环境气温 5℃ 的冷驯化条件下会出现下降的变化,而驯化温度降低至低于环境温度 10℃ 及以上会略有增加。这可能与油松毛虫幼虫的滞育体内生化反应缓慢以及个体间差异有关。

本文通过对油松毛虫越冬幼虫进行冷驯化实验,测定其过冷却点和耐寒性相关生理生化物质,探讨了冷驯化对不同越冬期幼虫的抗寒能力的影响。关于讨论中涉及到的油松毛虫越冬幼虫最有效低温驯化温度范围及时间范围以及是否可以人为降低油松毛虫幼虫的耐寒性,实现其在害虫防控中的实践意义等问题,还有待于进一步深入研究。

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. Prot.*, 91: 93–99.
- Bai XQ, Zhang XL, Zhang N, Zhang LS, Ma YB, 2016. A damage monitoring model based on hyperspectral remote sensing of *Dendrolimus tabulaeformis*. *Journal of Beijing Forestry University*, 38(11): 16–22. [白雪琪, 张晓丽, 张凝, 张连生, 马云波, 2016. 基于高光谱遥感的油松毛虫危害程度监测模型. 北京林业大学学报, 38(11): 16–22.]
- Bale JS, 1996. Insect cold hardiness: a matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93(3): 369–382.
- Behroozi E, Izadi H, Samih MA, Moharamipour S, 2012. Physiological strategy in overwintering larvae of pistachio white leaf borer, *Ocneria terebinthina* Strg. (Lepidoptera: Lymantriidae) in Rafsanjan, Iran. *Italian Journal of Zoology*, 79(1): 44–49.
- Chen CP, Denlinger DL, Lee RE, 1987. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Zoology*, 60(3): 297–304.
- Chen H, Liang GM, Zou LY, Guo F, Wu KM, Guo YY, 2010. Research progresses in the cold hardiness of insects. *Plant Protection*, 36(2): 18–24. [陈豪, 梁革梅, 邹朗云, 郭芳, 吴孔明, 郭予元, 2010. 昆虫抗寒性的研究进展. 植物保护, 36(2): 18–24.]
- Chen YJ, Sun XL, Zhang WG, Mou ZZ, Guo GZ, 2005. Relationship between variation of protein, amino acid, low-molecular carbohydrate in over-wintering *Diaphania pyralis* Walker larvae and cold-hardiness. *Science of Sericulture*, 31: 111–116. [陈永杰, 孙绪良, 张卫光, 郭彦彦, 牟志刚, 郭光智, 2005. 桑螟越冬幼虫体内蛋白质氨基酸碳水化合物的变化与抗寒性的关系. 蚕业科学, 31(2): 111–116.]
- Czajka MC, Lee RE, 1990. A rapid cold hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 148: 245–254.
- Danks HV, 1987. Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Ottawa: Biological Survey of Canada Press. 114–122.
- 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.]
- Feng YQ, Wang JL, Zong SX, 2014. Review of insect overwintering stages and cold-resistance strategies. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(9): 22–25. [冯宇倩, 王锦林, 宗世祥, 2014. 昆虫越冬虫态及耐寒策略概述. 中国农学通报, 30(9): 22–25.]
- 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. *Agr. Forest Entomol.*, 18(3): 302–312.
- Feng YX, He WX, 1994. Preliminary study on reducing cold resistance of stored-grain pests. (5): 1–4. [冯玉香, 何维勋, 1994. 降低储粮害虫抗寒力的初步研究. 中国农业气象, (5): 1–4.]
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497–509.
- Han RD, Sun XG, Xu YY, Zhang WG, 2005. The biochemical mechanism of cold-hardiness in overwintering larva of *Dendrolimus spectabilis* Butler (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Acta Ecologica Sinica*, 25(6): 1352–1356.
- Han ZJ, Wang YC, You ZP, 1989. Cold-hardiness mechanism of terrestrial insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 34(1): 39–42. [韩召军, 王荫长, 尤子平, 1989. 陆生昆虫的抗寒性机制. 昆虫知识, 34(1): 39–42.]
- Harrington RR, Fleming I, Woiwood P, 2001. Climate change impacts on insect management and conservation in temperate regions: Can they be predicted. *Agricultural and Forest Entomology*, 3: 233–240.
- Jing XH, Kang L, 2002. Research progress in insect cold hardiness. *Acta Ecologica Sinica*, 22(12): 2202–2207. [景晓红, 康乐, 2002. 昆虫耐寒性研究. 生态学报, 12(22): 2202–2207.]
- Jing XH, Kang L, 2004. Overview and evaluation of research methodology for insect cold hardiness. *Entomological Knowledge*, 41(1): 7–10. [景晓红, 康乐, 2004. 昆虫耐寒性的测定与评价方法. 昆虫知识, 40(1): 7–10.]
- Koveos DS, 2001. Rapid cold hardening in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3): 257–263.
- Lee RE, 1989. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 39(5): 308–313.

- Lee RE, 1991. Principles of Insect Low Temperature Tolerance // Lee RE, Denlinger DI (eds.). Insects at Low Temperature. New York: Springer US. 17–46.
- Li XP, Song LW, Zang 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. 蠮螋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, 2013. Biology characteristic and prevention of Chinese pine larva aculeata. *Modern Agricultural Science Technology*, (21): 165–167. [李燕, 2013. 油松毛虫生物学特性及其防治. 现代农业科技, (21): 165–167.]
- Lin W, 2008. Differences and mechanisms in cold tolerance of *Chilo suppressalis* larvae in different overwintering periods. Master dissertation. Hunan: Hunan Agricultural University. [林伟, 2008. 不同二化螟越冬幼虫种群抗寒性的差异及其机理研究. 硕士学位论文. 湖南: 湖南农业大学.]
- Liu YQ, 1963. An overview of the geographical distribution of *Dendrolimus* Germar in the eastern part of China. *Acta Entomologica Sinica*, 12(3): 345–353. [刘友樵, 1963. 松毛虫属(*Dendrolimus* Germar)在中国东部的地理分布概述. 昆虫学报, 12(3): 345–353.]
- Liu Z, Gong P, Wu K, Wei W, Sun J, Li D, 2007. Effects of larval host plants on over-wintering preparedness and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 53(10): 1016–1026.
- Michaud MR, Denlinger DL, 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.
- Ouyang F, Liu ZD, Yin J, Su J, Wang C, Ge F, 2011. Effect of transgenic Bt cotton on overwintering characteristics and survival of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 57(1): 153–160.
- Ouyang F, Ge F, 2014. Determination and analysis of antifreeze and cold resistance of insects. *Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1646–1652. [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.]
- Rajamohan A, Sinclair BJ, 2008. Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 54(4): 708–718.
- Saeidi F, Moharramipour S, Barzegar M, 2012. Seasonal patterns of cold hardiness and cryoprotectant profiles in *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 41(6): 1638–1643.
- Storey KB, Storey JM, 1991. Biochemistry of Cryoprotectants//Lee RE, Denlinger DI (eds.). Insects at Low Temperatures. New York: Springer. 64–93.
- Sun XG, Wang XH, Li ST, 2001. Mechanism and research progress of cold hardiness of insects. *Journal of Shandong Agricultural University*, 32(3): 393–396. [孙绪良, 王兴华, 李恕廷, 2001. 昆虫的抗寒机制及其研究进展. 山东农业大学学报, 32(3): 393–396.]
- Somme L, 1982. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Phys. A*, 73(4): 519–543.
- Tang WG, 2012. Studies on the biological characteristics and integrated control techniques of *Dendrolimus tabulaeformis*. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 58(1): 47–49. [汤文高, 2012. 油松毛虫生物学特性及综合防治技术研究. 陕西农业科学, 58(1): 47–49.]
- Wan J, Yan W, Liu L, Long XF, Li ZX, Tan WQ, 2014. Definitude of effective cooling rates of cold acclimation for old larvae of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver). *Chinese Journal of Tropical Crops*, 35(6): 1192–1197. [万婕, 阎伟, 刘丽, 龙雪峰, 李朝绪, 覃伟权, 2014. 红棕象甲高龄幼虫冷驯化有效降温速率的确定. 热带作物学报, 35(6): 1192–1197.]
- Xia RX, Xu LX, 1993. Study on the supercooling points of three caterpillars overwintering larvae in Liaoning province. *Scientia Silvae Sinicae*, (2): 186–189. [夏瑞心, 徐丽华, 1993. 辽宁三种松毛虫越冬幼虫过冷却点的研究. 林业科学, (2): 186–189.]
- 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.]
- Zachariassen KE, 1985. Physiology of cold tolerance in insect. *Physiol. Rev.*, 65(4): 799–832.
- Zeng JP, Ge F, Su JW, He Z, 2010. Researches on the occurrences of major forest insect pests of pine caterpillar *Dendrolimus* spp. in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(3): 451–459. [曾菊平, 戈峰, 苏建伟, 何忠, 2010. 我国林业重大害虫松毛虫的灾害研究进展. 昆虫知识, 47(3): 451–459.]
- Zhang LL, 2005. Several factors affecting the growth and development of *Dendrolimus tabulaeformis*. Master dissertation. Beijing: Beijing Forestry University. [张丽丽, 2005. 影响油松毛虫生长发育的几个因素的探讨. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学.]
- Zhao J, Yu L Y, Li M, Zheng FQ, Zhang F, Xu YY, 2008. Seasonal variation in cold tolerance of the multicolored ladybeetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) adults. *Acta Entomologica Sinica*, 51(12): 1271–1278. [赵静, 于令媛, 李敏, 郑方强, 张帆, 许永玉, 2008. 异色瓢虫成虫耐寒能力的季节性变化研究. 昆虫学报, 51(12): 1271–1278.]
- Zhu CH, Qu S, Zhang XL, 2016. Damage remote sensing monitoring and its impact factor analysis of *Dendrolimus tabulaeformis*. *Journal of Remote Sensing*, 20(4): 653–664. [朱程浩, 瞿帅, 张晓丽, 2016. 油松毛虫灾害遥感监测及其影响因子分析. 遥感学报, 20(4): 653–664.]