



大豆食心虫滞育期间体内代谢酶对温度诱导的响应

李东坡, 韩岚岚, 张旭霞, 赵奎军, 张文霖, 高云雷, 邓世群, 张傲楠

(东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为明确大豆食心虫在未滞育-滞育-滞育解除过程的代谢变化,准确测报大豆食心虫的发生时期,掌握防治时机,进而达到减少使用农药的目的,本试验研究了经4,13,18,23,25℃及室外自然温度不同温度处理后的大豆食心虫 *Leguminirora glycinioorella* 滞育前及进入滞育后,不同阶段其体内抗冻、滞育主要代谢酶-海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶、过氧化物酶活力的变化。结果表明:自然状态下进入滞育的大豆食心虫体内上述4种代谢酶的活力与未滞育时这4种代谢酶的活力均差异显著,海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶活力分别下降0.99,2.85和7.86 U·mg⁻¹,过氧化物酶活力升高1.58 U·mg⁻¹;与室外自然条件相比,4℃诱导大豆食心虫进入滞育初期,其体内海藻糖酶和丙酮酸激酶活力显著降低,过氧化物酶活力显著升高,而山梨醇脱氢酶活力在各诱导温度下保持平稳;不同滞育诱导温度处理大豆食心虫进入滞育后,在滞育初期(11月)、滞育中期(2月)、滞育解除(6月)代谢酶活力变化明显,其中23℃诱导的处理组在这3个滞育阶段的海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶活力均达到峰值,2月是大豆食心虫由滞育向滞育解除转折的关键期。研究结果可以为今后大豆食心虫的发生测报提供依据。

关键词:滞育;大豆食心虫;诱导温度;代谢酶;酶活

Metabolic Response of the Soybean Pod Borer (*Leguminirora glycinioorella*) During Diapause to Temperature

LI Dong-po, HAN Lan-lan, ZHANG Xu-xia, ZHAO Kui-jun, ZHANG Wen-lin, GAO Yun-lei, DENG Shi-qun, ZHANG Ao-nan

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The purpose was to clarify the metabolic changes during the period of nondiapause-diapause-diapause elimination of soybean pod borer (*Leguminirora glycinioorella*), measure the occurrence period of soybean pod borer accurately, grasp the timing of prevention and control, and then achieve the purpose of reducing the use of pesticides. Trehalase, sorbitol dehydrogenase, pyruvate kinase and peroxidase are main metabolic enzymes related to antifreeze and diapause of soybean pod borer. This study investigated the changes of those enzyme activity in soybean pod borer before and after diapause, treated with different diapause-inducing temperatures and different stages of diapause period at different temperatures(4, 13, 18, 23, 25℃ and outdoor). The results showed that the activity of the four metabolic enzymes of soybean pod borer diapaused under natural conditions were all significantly different compared with the pre-diapause activity of soybean pod borer. Among them, the activity of trehalase, sorbitol dehydrogenase, pyruvate kinase decreased by 0.99, 2.85 and 7.86 U·mg⁻¹, respectively, the peroxidase activity increased by 1.58 U·mg⁻¹. Compared with outdoor natural conditions, early diapause after 4℃ induction treatment, the activity of trehalase and pyruvate kinase were significantly decreased while the activity of peroxidase was significantly increased, however, the activity of sorbitol dehydrogenase remained stable under all induction temperatures. In different temperatures conditions, the activity of metabolic enzymes of soybean pod borer in early diapause(November), mid-diapause(February) and after the release of diapause(June) were significantly different. Among them, in the treatment group induced by 23℃, the trehalase, sorbitol dehydrogenase and pyruvate kinase enzyme activities peaked in those three diapause stages, February is the critical period when soybean pod borer changes from diapause to diapause termination. These results would provide basis for the occurrence and forecast of soybean pod borer in the future.

Keywords: Diapause; Soybean pod borer; Induction temperatures; Metabolic enzymes; Enzyme activity

收稿日期:2018-01-19

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04)。

第一作者简介:李东坡(1991-),男,硕士,主要从事昆虫生理与生态研究。E-mail: dongpoli88@163.com。

通讯作者:赵奎军(1960-),男,博士,教授,主要从事昆虫综合防治研究。E-mail: kjzhao@163.com。

韩岚岚(1970-),女,博士,副教授,主要从事昆虫生物化学与分子生物学研究。E-mail: hanll_neau@aliyun.com。

昆虫滞育是一个发育极其缓慢,并仍能使其适应不良自然环境获得生存本能的过程^[1]。昆虫在滞育过程中几乎不取食,但体内生理代谢过程仍然处于动态变化中^[2]。如生物学形态、生理生化指标、内分泌及基因调控等^[3-5],这种特殊的生理代谢使其在极端条件下仍能存活下来^[6-8]。温度作为影响滞育昆虫的一种重要的外界因素,对昆虫的生长发育、存活、越冬、繁殖等起着重要作用。冬季滞育昆虫由于要经历低温越冬,在滞育期间会积累海藻糖、山梨醇、丙酮酸、氧自由基等能稳定细胞膜结构^[9]、保护虫体内蛋白的抗冻保护性物质,并且通过降低代谢保证滞育期间和滞育解除后生长发育所需的能量,使得昆虫能顺利越冬^[10-11]。这些抗冻保护性物质通过昆虫体内的相关代谢酶来调控^[12-13]。

大豆食心虫(*Leguminivora glycinivorella*)属鳞翅目卷蛾科,是专性滞育的大豆害虫,以老熟幼虫入土作茧滞育,滞育期持续10个月,这种特殊的生活习性使得对大豆食心虫的发生预测和防治均比较困难^[14-15]。大豆食心虫滞育期间体内积累的海藻糖、山梨醇、丙酮酸、氧自由基等^[16]受温度影响,通过糖酵解、磷酸己糖代谢途径和抗冻保护性物质合成^[17]等中间代谢途径来调节这些物质的活力。这些物质能提高昆虫抗寒性^[18-19]和抗逆性^[20]。而温度诱导调节大豆食心虫体内海藻糖、山梨醇、丙酮酸、氧自由基等的代谢酶还未见相关报道。

为此,本试验研究了大豆食心虫滞育前、后,经不同诱导滞育温度处理后和滞育期不同阶段其体内海藻糖酶(trehalase, THL)、山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SH)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、过氧化物酶(oxidase, POD)的活力变化,分析了大豆食心虫滞育与外界温度的关系,以期了解大豆食心虫滞育机制,为大豆食心虫测报提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 供试昆虫为采集于哈尔滨向阳农场大豆田中的大豆食心虫未滞育的老熟幼虫。

1.1.2 试验仪器设备及试剂 常温高速离心机(Sigma)、高速低温冷冻离心机(Eppendorf)、人工气候箱(BIC,上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、多功能酶标仪(INFINITE-200 PRO,瑞士TECAN公司)、烘箱(DPH-781,湖北省黄石市医疗器械厂)、冰箱(美菱)、电热恒温水浴锅(DZKW-S-4,北京永光明医疗仪器厂)、电子天平(ER-180,AND)、石英砂(分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司)、无水乙

醇(天津市天力化学试剂有限公司)、代谢酶活力测定试剂盒(苏州科铭生物有限公司)。

1.2 试验设计

试验设4、13、18、23、25℃5个温度处理组和1个室外自然条件处理的对照组,上述5个温度处理的大豆食心虫均置于相对湿度为70%~80%,光周期为光照:黑暗=16 h:8 h的恒温培养箱中。对照组埋于深为距离土壤表面40 cm处,分别于(滞育初期,11月15日;滞育中期,2月15日;滞育解除,6月15日)取虫进行测试。9月室外平均温度为12~18℃;室外土壤平均温度:11月为0~6℃、2月为-4~0℃;6月为20~25℃。

通过测定不同虫态下4种代谢酶的活性分析:①室外自然条件下未滞育与滞育初期(11月)大豆食心虫体内海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶和过氧化物酶活力的变化;②室外自然条件与不同温度诱导对滞育初期(11月)大豆食心虫体内4种代谢酶活性的影响;③室外自然条件与上述5个诱导滞育温度处理进入滞育的大豆食心虫分别在滞育初期(11月)-滞育中期(2月)-滞育解除(6月)3个阶段虫体内上述4种代谢酶活力的变化。进一步分析大豆食心虫在未滞育-滞育-滞育解除过程中温度对其代谢酶的影响,进而明确大豆食心虫滞育与外界温度的关系。

1.3 方法

1.3.1 酶液制备 将未滞育的大豆食心虫从-80℃冰箱取出,置于冰上待测;随机从土茧中剥出各温度处理的大豆食心虫滞育幼虫,分别用75%酒精擦净,滤纸吸干酒精,称重后放入1.5 mL EP管中,并标记。按虫重与体积比1:9加入一定量生理盐水并放入少许石英砂,冰浴中充分研磨提取,匀浆液置4℃,10 000 r·min⁻¹离心10 min,重复2次,上清液即为酶源。测试时,每个处理重复4次。

1.3.2 代谢酶活力的测定 海藻糖酶(THL)、山梨醇脱氢酶(SH)、丙酮酸激酶(PK)、过氧化物酶(POD)活力的测定均按照苏州科铭生物有限公司生产的试剂盒使用说明。

(1)海藻糖酶:采用3,5-二硝基水杨酸法测定。海藻糖酶催化海藻糖产生的还原糖的含量,还原糖与3,5-二硝基水杨酸共热生成棕红色的氨基化合物,在一定范围内还原糖的量和反应液的颜色深度成正比,由此判断海藻糖酶活性的高低。在96孔酶标板中分别测定550 nm处测定管和对照管吸光值,每个测定管需设一个对照管。每mg组织蛋白在每分钟催化产生1 μg葡萄糖定义为一个酶活力单位。

(2)山梨醇脱氢酶:催化山梨醇脱氢生成果糖,同时还还原 NAD^+ 生成 NADH 。记录 340 nm 处吸光值,每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

(3)丙酮酸激酶:催化磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 生成 ATP 和丙酮酸,乳酸脱氢酶进一步催化 NADH 和丙酮酸生成乳酸和 NAD^+ 。记录 340 nm 处吸光值。每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

(4)过氧化物酶:催化 H_2O_2 , 氧化特定底物。记录 470 nm 处的吸光值。每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟变化 0.005 为一个酶活力单位。

1.4 数据分析

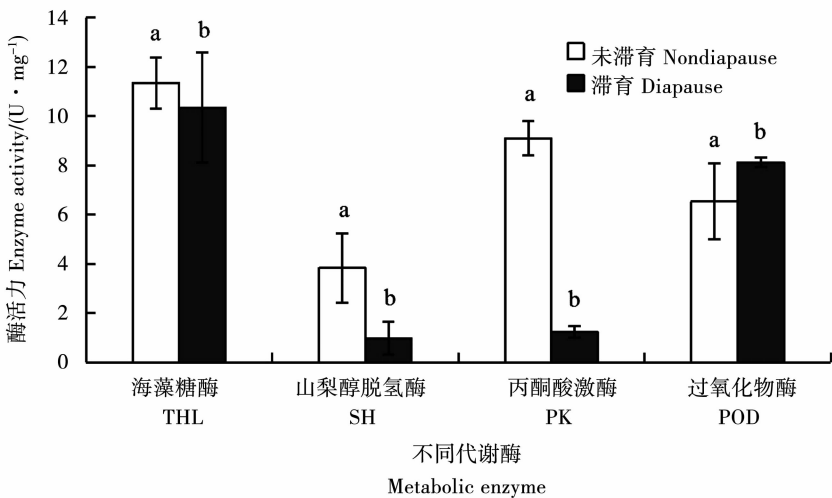
数据采用 SPSS 23.0 和 Excel 2007 数据处理软件进行分析、作图,通过独立样本 t - 检验和 Duncan's

新复极差法进行显著性检验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 未滞育与滞育阶段大豆食心虫体内代谢酶活力的比较

从图 1 中可以看出,自然条件下,未进入滞育(9 月)与进入滞育(11 月)的大豆食心虫体内的海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶、过氧化物酶的活力均差异显著($P < 0.05$),其中海藻糖酶酶活力由 $11.37 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 降到 $10.34 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$;山梨醇脱氢酶酶活力由 $3.84 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 降到 $0.98 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$;丙酮酸激酶酶活力由 $9.10 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 降到 $1.23 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,体内过氧化物酶酶活力由 $6.53 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 增加到 $8.12 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。结果表明:大豆食心虫在滞育前后体内 4 种代谢酶活力变化显著($P < 0.05$)。



柱形图上标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。
Different lowercase above bars indicated significant difference at 0.05 level. The same as below.

图 1 未滞育与滞育阶段大豆食心虫体内代谢酶活力

Fig. 1 The metabolic enzyme activity in soybean pod borer at diapause and not-diapause stages

2.2 不同滞育诱导温度对大豆食心虫体内代谢酶活力的影响

2.2.1 不同滞育诱导温度对大豆食心虫体内海藻糖酶活力的影响 从图 2 中可知,大豆食心虫经 5 个滞育诱导温度诱导进入滞育初期(11 月),其体内的海藻糖酶活力为 $5.74 \sim 11.41 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,且 5 个处理组的海藻糖酶活力均显著低于室外对照组(11 月,土壤平均温度为 $0 \sim 6^\circ\text{C}$)酶活力。其中 4, 13 和 25°C 诱导的 3 个处理组间差异不显著($P > 0.05$),这 3 个处理组海藻糖酶活力分别与 18 和 23°C 诱导处理组的大豆食心虫体内海藻糖酶活力差异显著($P < 0.05$)。结果表明:不同诱导温度下大豆食心虫体内海藻糖酶活力都比室外对照组代谢酶活力低,说明温度诱导大豆食心虫进入滞育过程中其体

内海藻糖酶的活力均有所下降且变化差异较大。
2.2.2 不同滞育诱导温度对大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶活力的影响 从图 3 中可知,大豆食心虫经 5 个滞育诱导温度诱导进入滞育初期,其体内的山梨醇脱氢酶活力为 $0.53 \sim 3.84 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,这 5 个温度诱导的大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶活力均低于在室外自然状态下(11 月,土壤平均温度为 $0 \sim 6^\circ\text{C}$)的酶活力,表现为差异显著($P < 0.05$)。其中,4, 13 和 18°C 诱导的 3 个处理组间山梨醇脱氢酶活力差异不显著($P > 0.05$),都高于 23 和 25°C 处理组的山梨醇脱氢酶活力,表现为差异显著($P < 0.05$)。结果表明:不同诱导温度下大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶活力均比室外对照组代谢酶活力低,低温 4°C 有利于山梨醇脱氢酶活力加强,高温 25°C 降低

山梨醇脱氢酶活力,但除了温度对大豆食心虫体内其活力有影响。山梨醇脱氢酶活力有影响外,可能还有其它因素对

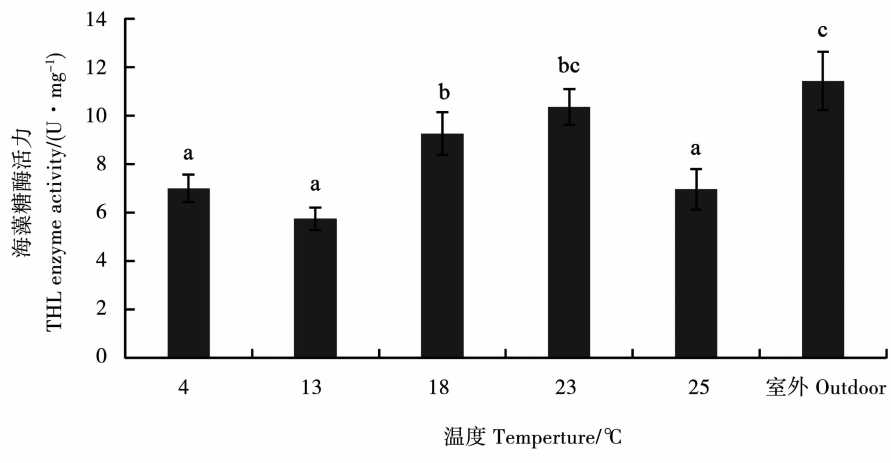


图2 不同滞育诱导温度下大豆食心虫体内海藻糖酶活力
Fig. 2 The enzyme activity of THL in soybean pod borer at different diapause-inducing temperatures

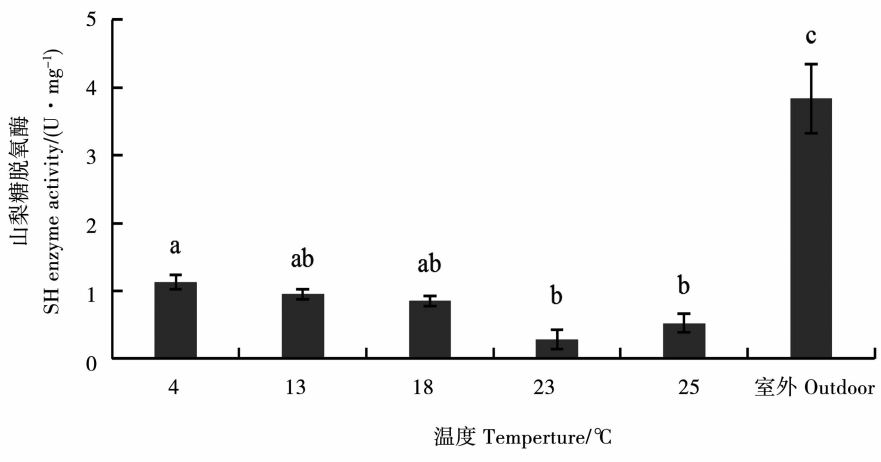


图3 不同滞育诱导温度下大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶活力
Fig. 3 The enzyme activity of SH in soybean pod borer at different diapause-inducing temperatures

2.2.3 不同滞育诱导温度对大豆食心虫体内丙酮酸激酶活力的影响 从图4中可以看出,大豆食心虫经5个滞育诱导温度诱导进入滞育初期(11月),其体内的丙酮酸激酶活力为6.29~18.71 U·mg⁻¹,这5个温度诱导的大豆食心虫与在室外自然状态下(11月,土壤平均温度为0~6℃)大豆食心虫体内的丙酮酸激酶活力间均差异显著($P < 0.05$),且5个处理组的丙酮酸激酶活力均显著低于室外对照组的丙酮酸激酶活力。其中23℃诱导处理组丙酮酸激酶活力最低,为6.29 U·mg⁻¹,与其余4个诱导温度处理组的丙酮酸激酶活力均差异显著($P < 0.05$)。结果表明:不同诱导温度的大豆食心虫体内过氧化物酶活力都显著低于室外对照组代谢酶活力,说明温度诱导大豆食心虫进入滞育过程中其体内丙酮酸激酶的活力变化较大。

2.2.4 不同滞育诱导温度对大豆食心虫体内过氧化物酶活力的影响 从图5中可以看出,大豆食心虫经5个滞育诱导温度诱导进入滞育初期(11月),其体内的过氧化物酶活力为13.75~29.13 U·mg⁻¹,这5个温度诱导的大豆食心虫与在室外自然状态下(11月,土壤平均温度0~6℃)大豆食心虫体内的过氧化物酶活力均差异显著($P < 0.05$)。其中,4和23℃诱导的2个处理组间、13和25℃诱导的2个处理组间过氧化物酶活力差异不显著($P > 0.05$),这2组处理组过氧化物酶活力与18℃诱导的处理组酶活力均差异显著($P < 0.05$)。结果表明:上述5种诱导温度处理的大豆食心虫体内过氧化物酶活力都比室外对照组代谢酶活力低,说明温度诱导对大豆食心虫体内过氧化物酶活力影响较大。

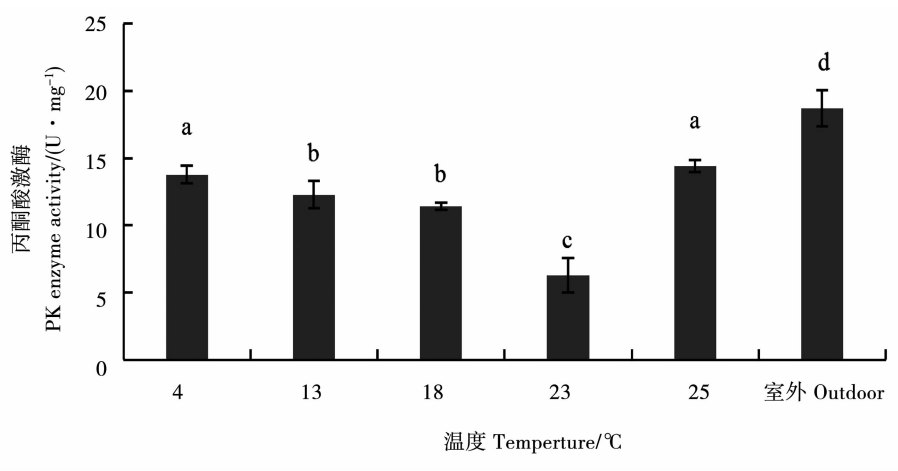


图 4 不同滞育诱导温度下大豆食心虫体内丙酮酸激酶活力
Fig. 4 The enzyme activity of PK in soybean pod borer at different diapause-inducing temperatures

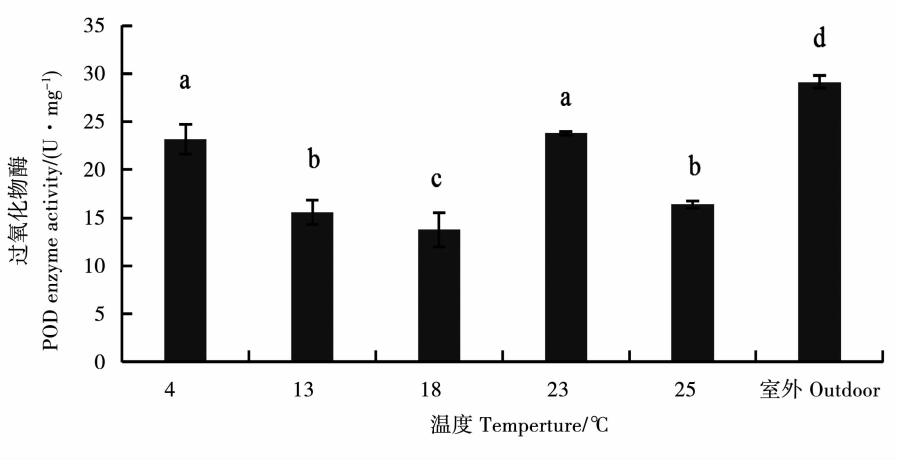


图 5 不同滞育诱导温度下大豆食心虫体内过氧化物酶活力
Fig. 5 The enzyme activity of POD in soybean pod borer at different diapause-inducing temperatures

2.3 不同温度对大豆食心虫滞育不同阶段体内代谢酶活力的影响

2.3.1 不同温度对大豆食心虫滞育期不同阶段体内海藻糖酶活力的影响 由图 6 可看出,4,13,18,23,25℃各处理组大豆食心虫海藻糖酶活力为 3.90 ~ 15.25 U·mg⁻¹,滞育初期(11 月)室外自然状态下(土壤平均温度 0 ~ 6℃)虫体内的海藻糖酶活力与 23℃处理组的酶活力差异不显著($P > 0.05$),与其它温度处理组其活力均差异显著($P < 0.05$)。滞育中期(2 月)室外自然状态下(土壤平均温度为 -4 ~ 0℃)虫体内的海藻糖酶活力与 13℃处理组活力差异不显著($P > 0.05$),与其它温度处理组其活力均差异显著($P < 0.05$)。滞育解除后(6 月)室外自然状态下(土壤平均温度 20 ~ 25℃)虫体内的海藻糖酶活力与 18 和 23℃处理组活力均差异不显著($P > 0.05$),与其它温度处理组的活力均差异显著($P < 0.05$)。11 月、2 月、6 月这 3 个滞育阶段虫体内海

藻糖酶活力随着滞育深度的延长呈先升高后降低的趋势,除 23℃条件下滞育初期(11 月)和滞育中期(2 月)虫体内海藻糖酶活力差异不显著外,其它温度处理组在这 3 个滞育阶段的大豆食心虫体内海藻糖酶活力均差异显著($P < 0.05$)。结果表明,大豆食心虫体内海藻糖酶在 4 和 25℃处理组在这 3 个滞育阶段的酶活力与各阶段室外条件下对应的酶活力均差异显著。大豆食心虫经不同温度诱导进入滞育后体内的海藻糖酶活力在滞育中期(2 月)均达到最高值。

2.3.2 不同温度对大豆食心虫滞育期不同阶段体内山梨醇脱氢酶活力的影响 由图 7 可看出,各处理组大豆食心虫山梨醇脱氢酶活力为 0.23 ~ 1.91 U·mg⁻¹,滞育初期(11 月)室外自然状态下(土壤平均温度 0 ~ 6℃)虫体内的山梨醇脱氢酶活力与 5 种温度处理组活力均差异显著($P < 0.05$)。滞育中期(2 月)室外自然状态下(土壤平均温度为 -4 ~

0℃)虫体内的山梨醇脱氢酶活力与在4℃处理组大豆食心虫体内的山梨醇脱氢酶活力差异不显著($P>0.05$),与其它温度处理组活力均差异显著($P<0.05$)。滞育解除后(6月份)室外自然状态下(土壤平均温度20~25℃)虫体内的山梨醇脱氢酶活力与在25℃处理组的活力差异不显著($P>0.05$),与其它温度处理组的活力均差异显著($P<0.05$)。11月、2月、6月3个滞育阶段的大豆食心虫体内山梨

醇脱氢酶活力随着滞育深度的延长呈先升高后降低的趋势,且大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶活力在3个滞育阶段间均差异显著($P<0.05$)。结果表明:大豆食心虫体内山梨醇脱氢酶在4,13,18和23℃处理组3个滞育阶段的酶活力与各阶段室外条件下对应的酶活力差异显著。大豆食心虫经不同温度诱导(4,13,18,23,25℃)进入滞育后体内山梨醇脱氢酶活力在滞育中期(2月)达到最高值。

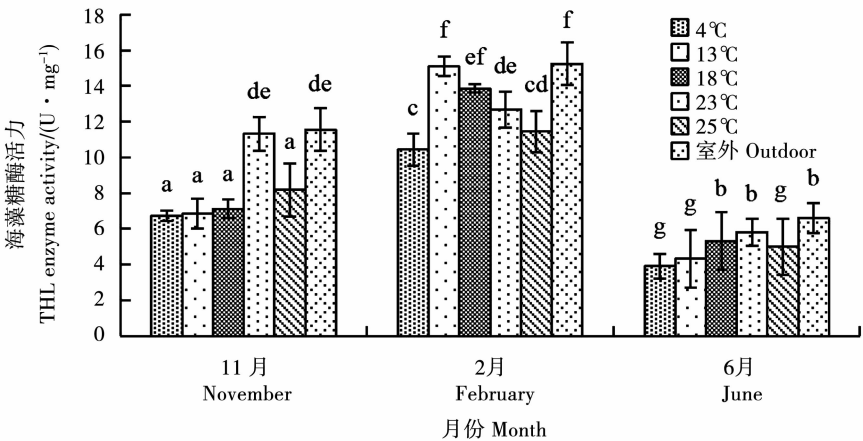


图6 不同温度下大豆食心虫滞育不同阶段体内海藻糖酶活力
Fig. 6 The enzyme activity of THL in different diapause periods of soybean pod borer under different temperatures

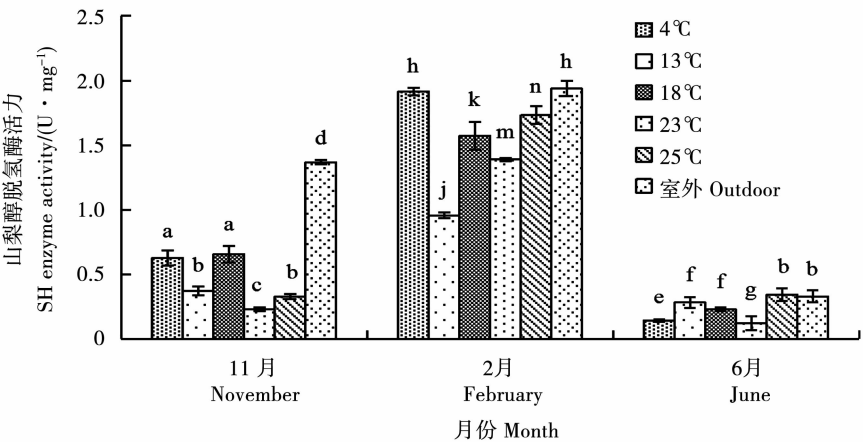


图7 不同温度下大豆食心虫滞育不同阶段体内山梨醇脱氢酶活力
Fig. 7 The enzyme activity of SH in different diapause periods of soybean pod borer under different temperatures

2.3.3 不同温度对大豆食心虫滞育期不同阶段体内丙酮酸激酶活力的影响 由图8可看出,各处理组大豆食心虫丙酮酸激酶活力为1.57~33.60 U·mg⁻¹,这5个不同温度处理组的大豆食心虫体内的丙酮酸激酶活力与在室外自然状态下活力均差异显著($P<0.05$)。随着滞育处理温度的升高大豆食心虫在滞育初期(11月,土壤平均温度0~6℃)、滞育中期(2月,土壤外平均温度-4~0℃)、滞育解除后(6月,土壤平均温度20~25℃)体内丙酮酸激酶活力都呈先降低后升高的趋势,这3个滞育阶段间均达到差

异显著水平($P<0.05$),且在2月份都达到最低值。其中,23℃诱导进入滞育的大豆食心虫体内的丙酮酸激酶在11月、2月、6月的活力均为最低,分别为6.29,1.57和19.90 U·mg⁻¹。结果表明:大豆食心虫体内丙酮酸激酶在23℃处理组在这3个滞育阶段的酶活力比其它温度(4,13,18,25℃)和室外条件下对应的酶活力都低,且达到最低值。大豆食心虫经不同温度诱导(4,13,18,23,25℃)进入滞育后体内的丙酮酸激酶活力在滞育中期(2月)达到最低值。

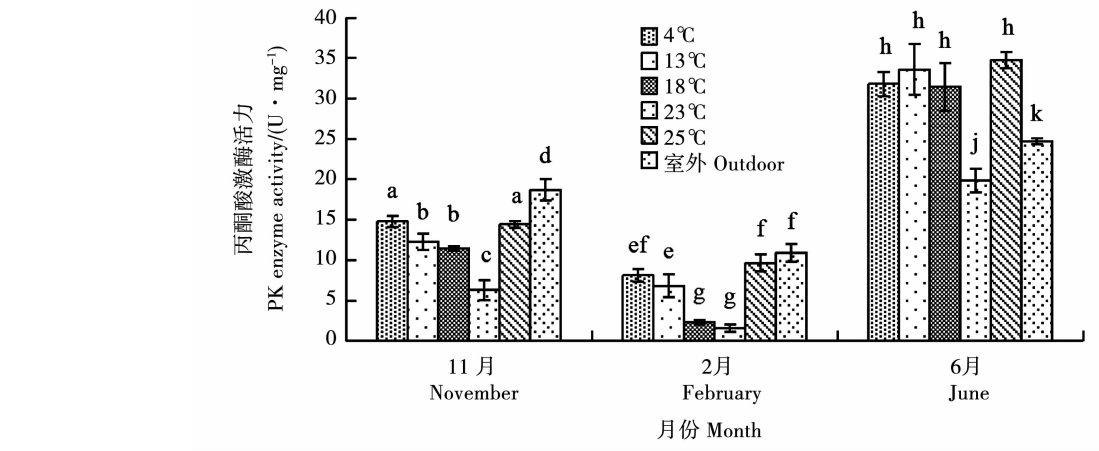


图8 不同温度下大豆食心虫滞育不同阶段体内丙酮酸激酶活力
Fig. 8 The enzyme activity of PK in different diapause periods of soybean pod borer under different temperatures

2.3.4 不同温度对大豆食心虫滞育期不同阶段体内过氧化物酶活力的影响 由图9可看出,4,13,18,23,25℃各处理组大豆食心虫过氧化物酶活力为7.55~36.18 U·mg⁻¹,滞育初期(11月)室外自然状态下(土壤平均温度0~6℃)虫体内的过氧化物酶活力与5种温度处理组的活力均差异显著($P < 0.05$)。滞育中期(2月)室外自然状态下(土壤平均温度-4~0℃)大豆食心虫体内的过氧化物酶活力与25℃处理组的活力差异不显著($P > 0.05$),与其它温度处理下的活力均差异显著($P < 0.05$)。滞育解除后(6月)室外自然状态下(土壤平均温度20~25℃)虫体内的过氧化物酶活力与4和23℃处理组的活力均差异不显著($P > 0.05$),与其它温度处理下的活力均差异显著($P < 0.05$)。11月、2月、6月

3个滞育阶段大豆食心虫体内过氧化物酶活力随着滞育深度的延长呈先升高后降低的趋势,除13℃条件下滞育初期(11月)和滞育中期(2月)虫体过氧化物酶活力差异不显著外,其它温度处理下3个滞育阶段的大豆食心虫体内过氧化物酶活力均差异显著($P < 0.05$),且在2月份都达到最高值。结果表明:滞育初期(11月)和滞育解除期(6月)大豆食心虫体内过氧化物酶在18℃处理组的酶活力比其他温度(4,13,18,25℃)和室外条件下对应的酶活力都低,且达到最低值。大豆食心虫在不同温度诱导(4,13,18,23,25℃)进入滞育的3个主要阶段(滞育前期、滞育中期、滞育解除后)体内丙酮酸激酶活力变化显著,其中在滞育中期(2月)达到最高值。

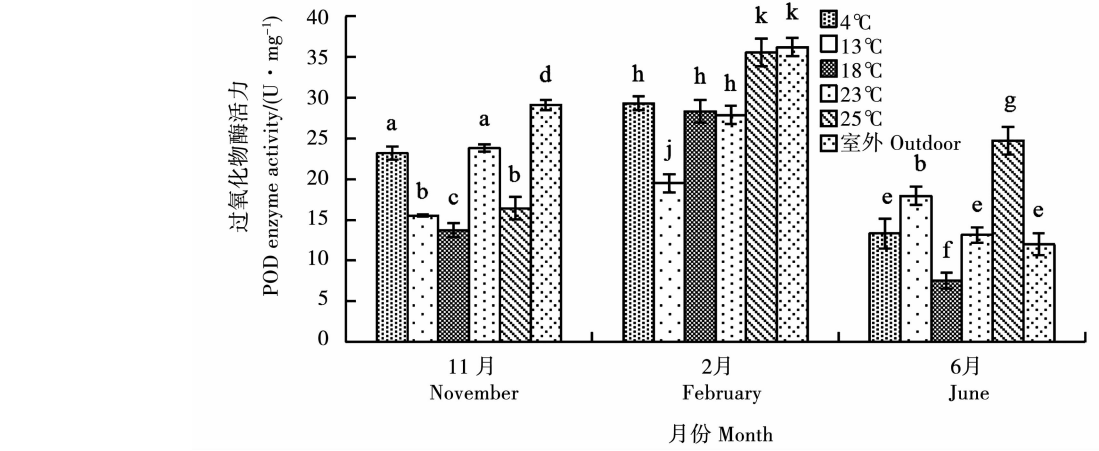


图9 不同温度下大豆食心虫滞育不同阶段体内过氧化物酶活力
Fig. 9 The enzyme activity of POD in different diapause periods of soybean pod borer under different temperatures

3 讨论

在大豆食心虫滞育过程中,温度的变化能直接影响其体内代谢酶的活力。在本研究中,大豆食心虫进入滞育初期(11月)时,其体内海藻糖酶、山梨醇脱氢酶和丙酮酸激酶的活力比滞育前表现出下降趋势,而过氧化物酶活力表现出升高的趋势,这说明此时虫体内代谢速率下降,海藻糖和山梨醇等抗冻物质开始在体内积累^[21-22];自由基含量逐渐减少,大豆食心虫抗逆能力增强,以便顺利进入滞育^[23-24];糖酵解途径被抑制,呼吸代谢能力减弱,体内代谢随之减弱^[25-26]。

大豆食心虫经4,13,18,23,25℃5个滞育诱导温度诱导进入滞育后,在滞育初期(11月)的23℃,大豆食心虫体内海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶均达到峰值,23℃诱导处理的大豆食心虫体内丙酮酸激酶在滞育初期、滞育中期和滞育解除期均达到最低值,说明23℃处理可能为诱导过程中大豆食心虫体内这4种酶活力的转折温度,是大豆食心虫的滞育代谢的最适温度;至滞育中期(2月),其体内海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶、过氧化物酶的活力均达到了峰值,此时海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、过氧化物酶的活力达到了最高,在滞育解除期(6月)这3种酶活力降低;而丙酮酸激酶活力达到了滞育期的最低,在滞育解除期(6月)丙酮酸激酶活力升高。说明不同温度处理对大豆食心虫体内这4种代谢酶活力的影响较大。因此,2月是大豆食心虫滞育期间代谢的发生转折变化时期,是由深度滞育向滞育解除转变的关键期,即滞育“苏醒期”,代谢开始由弱转强。这个关键转折期也许能为大豆食心虫的测报提供一定的科学依据。

经4℃诱导进入滞育的大豆食心虫体内海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活力与室外条件下(11月,土壤平均温度0~6℃)酶活力相比显著降低,说明4℃诱导下大豆食心虫体内积累大量的海藻糖和山梨醇,保护其体内免受低温带来的伤害,这也证实了海藻糖和山梨醇是虫体的抗冻剂^[27]的理论。本结果与张顺益等^[28]研究发现桃小食心虫随滞育时间延长海藻糖酶活力降低的结果相反,这也说明物种间的滞育机制存在差异。大豆食心虫在室外条件下(11月,土壤平均温度0~6℃)体内的过氧化物酶活力比5个温度诱导滞育处理下的酶活力高很多,可能是由于5个诱导温度处理组的大豆食心虫为恒定温度处理进入滞育,而室外对照组因环境温度的变化而变化,此时大豆食心虫为了应对环境温度的变化,其体内的过氧化物酶一直处于较高的活力,这

样可确保虫体安全越冬。这说明大豆食心虫滞育期间与温度的关系密切,温度的变化能直接导致虫体内代谢的改变,进而影响其滞育过程。

滞育解除后(6月)大豆食心虫体内海藻糖酶与丙酮酸激酶活力随温度升高其变化趋势一致。说明此时大豆食心虫体内代谢恢复并逐渐增强,上述两种酶都参加虫体内糖酵解活动,一个为糖原生成的直接参与者,一个为糖酵解的中间反应酶,这两种酶活力的变化表现出“连带效应”。另外分析还发现,经不同诱导滞育温度处理后大豆食心虫在不同滞育阶段体内上述4种代谢酶活力的转折点不同,可能由于不同代谢酶在参与相应的代谢途径时活跃程度不一样。

4 结论

自然条件下大豆食心虫滞育前和刚进入滞育后体内海藻糖酶、山梨醇脱氢酶、丙酮酸激酶、过氧化物酶的活力变化显著。大豆食心虫从滞育初期(11月)-滞育中期(2月)-滞育解除(6月)3个阶段在4,13,18,23和25℃温度诱导处理的各处理组体内海藻糖酶活力随着诱导滞育温度的升高,均呈先升高后降低的趋势;丙酮酸激酶活力在这3个阶段均呈先降低后升高的趋势,而山梨醇脱氢酶和过氧化物酶活力在上述5个温度诱导处理组处理后没有呈现明显的规律,说明这两种酶活力除受温度影响外,还受其它因素的影响。这3个滞育期的上述4种代谢酶活力分别在2月达到峰值,2月为大豆食心虫由滞育转向滞育解除的转折关键期。本研究结果表明可通过监测代谢酶的活力变化预测大豆食心虫的发育阶段,为深入了解大豆食心虫的滞育机制并对其进行有效防治提供科学依据。

参考文献

[1] Tauber M J, Tauber C A, Masaki S. Seasonal adaptations of insects[M]. New York: Oxford University Press, 1986.

[2] 任小云, 齐晓阳, 安涛, 等. 滞育昆虫营养物质的积累、转化和调控[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(4): 685-695. (Ren X Y, Qi X Y, An T, et al. Research on the accumulation, transformation and regulation of nutrients in diapause insects[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(4): 685-695.)

[3] Denlinger D. Regulation of diapause[J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47: 93-122.

[4] Burnell A M, Houthoofd K K, Vanfleteren J R. Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Experimental Gerontology, 2005, 40(11): 850-856.

[5] Denekamp N Y, Thorne M A, Clark M S, et al. Discovering genes associated with dormancy in the monogonontrotifer, *Brachionus plicatilis* [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 108.

- [6] Mansingh A. Physiological classification of dormancies in insects [J]. Canadian Entomologist, 1971, 103(3): 983-1009.
- [7] Storey K B, Storey J M. Freeze tolerance in animals [J]. Physiological Reviews, 1988, 68(1): 27-84.
- [8] Denlinger D L. Relationship between cold hardiness and diapause [J]. Insects at Low Temperature, 1991, 174-198.
- [9] 成为宁, 李修炼, 李怡萍, 等. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 133-139. (Cheng W N, Li X L, Li Y P, et al. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitodiplosismosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages [J]. Acta Entomologica Sinica, 2009, 2(2): 133-139.)
- [10] Hahn D A, Denlinger D L. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization [J]. Journal of Insect Physiology, 2007, 53(8): 760-773.
- [11] Hahn D A, Denlinger D L. Energetics of insect diapause [J]. Annual Review of Entomology, 2011, 56: 103-121.
- [12] Rojas R R, Charlet L D, Leopold R A. Trehalose accumulation in the overwintering larvae of the long-horned sunflower girdler, *Dectestexanus* [J]. Cryo-Letters, 1994a, 15: 394-398.
- [13] Rojas R R, Charlet L D, Leopold R A. Biochemistry and physiology of overwintering in the mature larvae of the sunflower stem weevil, *Cylindrocopturus* (Coleoptera: Curculionidae) in the northern great plains [J]. Insect Physiology, 1994b, 40: 201-205.
- [14] 刘洋, 王继安, 赵奎军. 大豆抗食心虫性遗传研究 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(2): 138-141. (Liu Y, Wang J A, Zhao K J. Study on the inheritance law of soybean resistance to pod borer [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(2): 138-141.)
- [15] 高月波, 卢宗志, 孙雅杰, 等. 大豆食心虫预测预报的研究与应用 [J]. 吉林农业科学, 2005, 30(3): 18-20. (Gao Y B, Lu Z Z, Sun Y J, et al. Studies on forecasting the occurrence of Soybean Moth (*Leguminivora glycinivorella*) and its application [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2005, 30(3): 18-20.)
- [16] 程媛, 韩岚岚, 赵奎军, 等. 寄主植物与温度对大豆食心虫滞育期间糖类和脂质含量的影响 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(4): 716-722. (Cheng Y, Han L L, Zhao K J, et al. Effect of host plants and temperature on the accumulation of carbohydrate lipid and water in soybean pod borer, *Leguminivora glycinivorella* (Mats.) Obraztsov [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(4): 716-722.)
- [17] Yaginuma T, Kobayashi M, Yamashita O. Distinct effects of different low temperatures on the induction of NAD-sorbitol dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyxmori* [J]. Journal of Comparative Physiology B, 1990, 160(3): 277-285.
- [18] 范兰芬, 钟杨生, 林健荣. 家蚕滞育卵与非滞育卵中几种关键酶活性的比较 [J]. 昆虫学报, 2011, 54(11): 1258-1263. (Fan L F, Zhong Y S, Lin J R. Comparison of related enzyme activities between diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyxmori* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(11): 1258-1263.)
- [19] Li Y P, Goto M, Ding L, et al. Diapause development and acclimation regulating enzymes associated with glycerol synthesis in the Shonai ecotype of the rice stem borer larva, *Chilosuppressalis* Walker [J]. Journal of Insect Physiology, 2002, 48(3): 303-310.
- [20] 李毅平, 朴镐用. 松针瘦蚊越冬幼虫体内酶活性的时序变化 [J]. 昆虫学报, 2000, 43(3): 227-232. (Li Y P, Pu H Y. Profile of enzymic activity in overwintering mature larvae of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2000, 43(3): 227-232.)
- [21] 张顺义, 秦华伟, 任凤山, 等. 桃小食心虫滞育过程中 5 种代谢酶活力变化 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(6): 97-100. (Zhang S Y, Qin H W, Ren F S, et al. Activity changes of five metabolic enzymes in *Carposinasasakii* Matsumura during diapause [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(6): 97-100.)
- [22] 王洪亮, 仵均祥, 王丙丽. 麦红吸浆虫滞育期间海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的变化 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2006, 34(8): 139-142. (Wang H L, Wu J X, Wang B L. Changes of trehalase and sorbitol dehydrogenase activity in *Sitodiplosismosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae during mature and diapause stage [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2006, 34(8): 139-142.)
- [23] 张晓燕, 翟一凡, 庄乾营, 等. 昆虫滞育研究进展 [J]. 山东农业科学, 2015, 45(2): 86-90. (Zhang X Y, Zhai Y F, Zhuang Q Y, et al. Advances in insect diapause studies [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 45(2): 86-90.)
- [24] 林炜, 刘玉娣, 侯茂林, 等. 不同地理种群二化螟滞育和解除滞育幼虫的抗逆性酶活性比较 [J]. 植物保护, 2007, 33(5): 84-87. (Lin W, Liu Y D, Hou M L, et al. Comparison of the activities of stress-tolerant enzymes in diapaused and diapause-terminated larvae of *Chilosuppressalis* from different geographic populations [J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 84-87.)
- [25] 刘慧霞, 李新岗, 吴文君. 昆虫生物化学 [M]. 西安: 陕西科学出版社, 1998. (Liu H X, Li X G, Wu W J. Insect biochemistry [M]. Xi'an: Shanxi Science Press, 1998.)
- [26] 何超, 孟泉科, 花蕾. 梨小食心虫滞育过程中几种代谢酶活力的相关变化 [J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 401-405. (He C, Meng Q K, Hua L. Related changes of activities of several metabolic enzymes in larvae of Oriental fruit moth, *Grapholitha molesta*, during diapause period [J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(5): 401-405.)
- [27] Ryde U. On the role of Glu-68 in alcohol dehydrogenase [J]. Protein Science, 1995, 4(6): 1124-1132.
- [28] 张顺益, 秦华伟, 任凤山, 等. 桃小食心虫滞育过程中 5 种代谢酶活力变化 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(6): 97-100. (Zhang S Y, Qin H W, Ren F S, et al. Activity changes of five metabolic enzymes in *carposina sasakii* matsumura during diapause [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(6): 97-100.)