

短时高温胁迫对双斑长跗萤叶甲雌虫游离氨基酸、海藻糖和可溶性糖的影响

马晓江, 张志虎, 王 中, 张艳香, 陈 静*

(石河子大学农学院, 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区普通高校重点实验室, 石河子 832003)

摘要 双斑长跗萤叶甲是新疆北疆棉花的主要害虫之一, 为探索短时高温对双斑长跗萤叶甲雌虫部分生理指标的影响, 在室内研究了不同高温(33、37、41、45℃)不同时间(0.5、1.5、2.5、6、12 h)处理条件下, 双斑长跗萤叶甲雌虫体内游离氨基酸、可溶性糖及海藻糖的变化规律。结果表明: 在相同温度处理下, 随处理时间的延长, 双斑长跗萤叶甲雌虫体内的游离氨基酸含量降低, 可溶性糖和海藻糖含量增加; 在处理时间相同时, 随处理温度的升高, 双斑长跗萤叶甲雌虫体内游离氨基酸含量降低, 可溶性糖含量和海藻糖含量增加。双斑长跗萤叶甲雌虫对 45℃ 高温也有一定的适应性, 这预示着在气候变暖趋势下, 双斑长跗萤叶甲仍将是新疆棉花上重要的害虫之一。

关键词 双斑长跗萤叶甲; 高温暴露; 游离氨基酸; 可溶性糖; 海藻糖

中图分类号: S 435.622 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017120

Effects of brief exposure to high temperature on free amino acids, total sugar and trehalose of female adult *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky)

MA Xiaojang, ZHANG Zhihu, WANG Zhong, ZHANG Yanxiang, CHEN Jing

(Key Laboratory for Regular Institution of Higher Learning for Oasis Agricultural Pest Management and Plant-Protection Resource Utilization in Xinjiang Uygur Autonomous Region, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky) is one of the most serious pests in cotton fields in the north of Xinjiang. This study was aimed to explore the potential physiological and biochemical responses of female adult *M. hieroglyphica* exposed to high temperature. The variation in free amino acids, total sugar and trehalose in female adult bodies were measured under climate chamber conditions under consistent temperature regimes of 33–45℃ at 4℃ intervals for 0.5 h, 1.5 h, 2.5 h, 6 h and 12 h, respectively. Under the same heat treatment, with the extension of treatment time, the concentration of free amino acids was decreased, while the concentrations of total sugar and trehalose were increased in female adult *M. hieroglyphica*. For the same treatment time, with rising temperature, the concentration of free amino acids was reduced, but the concentrations of total sugar and trehalose were increased in female adult *M. hieroglyphica*. *M. hieroglyphica* even had a certain adaptability to 45℃, and thus is a serious pest to the cotton in Xinjiang under global climate warming.

Key words *Monolepta hieroglyphica*; high temperature exposure; free amino acid; total sugar; trehalose

双斑长跗萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky) 属鞘翅目 Coleoptera, 叶甲科 Chrysomelidae, 长跗萤叶甲属 *Monolepta* Chevrolat, 又称双斑萤叶甲。该虫在国内主要分布于甘肃、宁夏、

黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、山西和陕西等 21 个省/自治区^[1-4]。近些年, 新疆棉区棉花耕作方式的改变, 棉花种植的集中化及品种的单一化为双斑长跗萤叶甲提供了良好的生存环境, 使该叶甲种群

收稿日期: 2017-04-01 修订日期: 2017-07-10

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31460473); 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室开放基金(KFJJ20160105); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCSX201718)

* 通信作者 E-mail: baxtxiao@sina.com

迅速扩散蔓延,成为北疆棉区主要害虫之一^[5]。双斑长跗萤叶甲以成虫取食棉花叶片,造成棉花叶片表面形成缺刻,甚至坏死斑,使棉花的光合作用受到严重影响,从而给棉花的生产带来巨大损失^[6-7]。目前,有关双斑长跗萤叶甲的研究主要集中于其发生规律、寄主范围、防治方法等^[3, 7-8]。

昆虫属变温动物,环境温度是影响其生长、发育、存活及生殖等生命活动的重要因素。当环境温度超过其适宜温区,就会造成热胁迫。有关环境温度对双斑长跗萤叶甲的影响,仅有对其成虫寿命、繁殖和种群动态的研究^[2,9],而由于气候变暖带来的高温频率增加和日高温升高对双斑长跗萤叶甲的影响尚未见报道。

本研究在实验室条件下采用不同高温与不同时间处理,研究短时高温暴露条件下双斑长跗萤叶甲雌虫体内可溶性糖、游离氨基酸和海藻糖的变化,以期考查双斑长跗萤叶甲对高温胁迫的适应能力,同时对解析该虫的耐热性及夏季田间种群数量动态,制定适宜的防治策略具有重要意义,也为进一步研究高温对双斑长跗萤叶甲影响的生理机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

双斑长跗萤叶甲成虫采自新疆石河子大学试验站(43°20'N, 84°45'E)棉田,在自制的养虫盒(10 cm×6 cm×6 cm)内用棉花叶片饲养,饲养条件:PXZ 型智能人工气候箱,温度 26℃±1℃,光周期 L//D=16 h//8 h,相对湿度(RH)为(80%±5%)。

1.2 试验材料及仪器

游离氨基酸测定试剂盒和蛋白质测定试剂盒,南京建成生物工程研究所生产;可溶性糖测定试剂盒,上海岚派生物科技有限公司生产;海藻糖测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;TGL-16gR 型离心机,UV1800 型分光光度仪,Varskan flash 3001 型酶标仪。

1.3 试验方法

1.3.1 高温处理方法

试验设 33、37、41、45℃ 4 个温度处理,温度误差±1℃。每个温度分别设 0.5、1.5、2.5、6、12 h 5 个处理时间(处理于每日 10:00 开始)。分别测定不同温度处理不同时间后双斑长跗萤叶甲雌虫游离氨基酸、可溶性糖和海藻糖浓度的变化。每个处理重复 3 次,每次 30 头成虫。

1.3.2 游离氨基酸的测定方法

用 10 mL 离心管称取 6~8 头经短时高温处理的双斑长跗萤叶甲雌虫活体按质量体积比加入 9 倍生理盐水,冰水浴条件机械匀浆制成 10% 匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液测定蛋白质及游离氨基酸含量。

蛋白质含量测定:取 10% 匀浆加入 9 倍生理盐水稀释成 1% 组织匀浆,然后分别取 0.05 mL 匀浆液、0.05 mL 双蒸水(空白管)、0.05 mL 0.563 g/L 蛋白质标准品(标准管)于试管中,依次加入 3 mL 考马斯亮蓝显色液,混匀,静置 10 min,在波长 595 nm,光径 1 cm,双蒸水调零后测定各管吸光度值,并计算蛋白质含量。

游离氨基酸含量测定:按照游离氨基酸测定试剂盒说明书对样品组织 10% 匀浆进行处理。波长 650 nm,光径 1 cm,双蒸水调零,测定各管吸光度值。

蛋白浓度(g/L)=(OD_{样品} - OD_{空白})×0.563/(OD_{标准} - OD_{空白}),式中 0.563 为标准品蛋白浓度,单位 g/L。

游离氨基酸含量(μmol/mg)=(OD_{样品} - OD_{空白})/(OD_{标准} - OD_{空白})×50/该样品的匀浆蛋白浓度(g/L),式中 50 为游离氨基酸标准品浓度,单位 μmol/mL。

1.3.3 海藻糖的测定

采用蒽酮比色法。称取约 0.1 g 双斑长跗萤叶甲活雌虫,常温研碎,加入 1 mL 提取液,室温静置 45 min,振荡 3~5 次,冷却后,1 000 r/min 常温离心 10 min,取上清液按照可溶性糖测定试剂盒说明书的步骤进行处理。测定波长 620 nm,光径 1 cm,双蒸水调零,测定各管吸光度值。

海藻糖含量(mg/g 鲜重)=[V₁×(OD_{样品} - 0.072 9)/8.897 6]/(W×V₁/V₂)=0.112×(OD_{样品} - 0.072 9)/W,式中,V₁ 为反应体系中样品体积 0.06 mL,V₂ 为提取液总体积 1 mL,W 为样品质量。

1.3.4 可溶性糖的测定

用 1.5 mL 离心管称取 6~8 头经短时高温处理的双斑长跗萤叶甲活雌虫按重量体积比加入 4 倍生理盐水,制成 20% 匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液待测。将可溶性糖标准品用标准品稀释液稀释成 240、120、60、30、15 ng/L 浓度的标准液各 50 μL。将样品上清液及标准品稀释液按照可溶性糖测定试剂盒说明书的步骤依次加入酶标板中,以空白孔调零,用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度,通

过标准曲线计算样品中昆虫可溶性糖含量。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 统计软件对所有试验数据进行分析。不同温度和处理时间对双斑长跗萤叶甲雌虫游离氨基酸、可溶性糖和海藻糖的影响采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验($\alpha=0.05$)。采用 Excel 软件绘图。

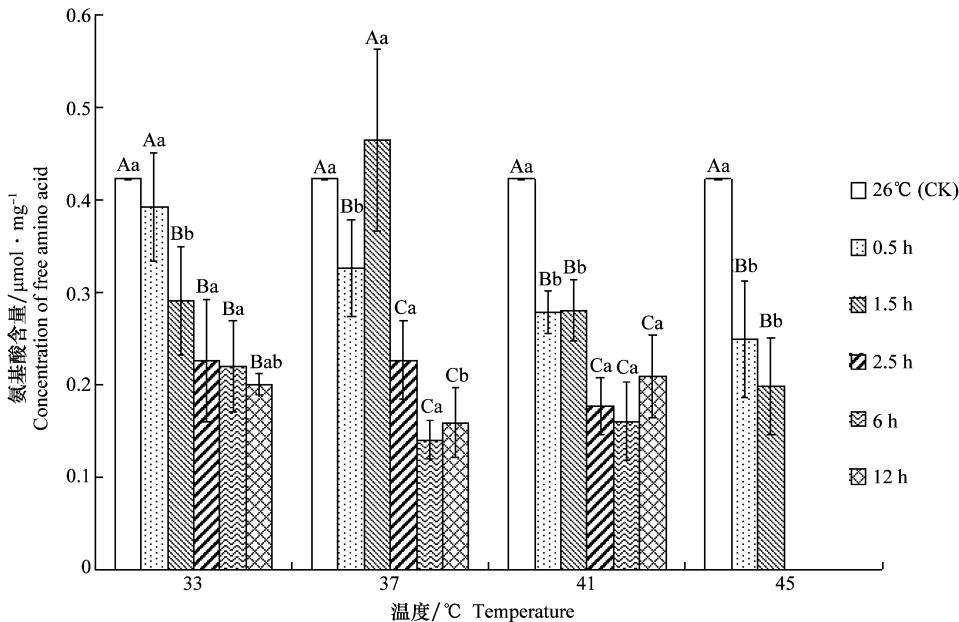
2 结果与分析

2.1 高温胁迫下双斑长跗萤叶甲雌虫游离氨基酸含量的变化

经短时高温处理后,与对照(26℃)相比,33、41、45℃下处理不同时间双斑长跗萤叶甲雌虫体内游离氨基酸含量随处理时间的延长而减少,除 33℃处理

0.5 h 外其他处理均显著低于 26℃对照,且呈现出处理时间越长,游离氨基酸含量下降幅度越大的趋势。37℃处理除了 1.5 h 游离氨基酸含量与对照 26℃无显著差异外,其他处理时间均显著低于对照(图 1)。45℃处理 2 h 后双斑长跗萤叶甲雌虫全部死亡。

处理时间为 0.5 h 和 2.5 h 时,双斑长跗萤叶甲成虫体内的游离氨基酸含量表现为随处理温度的升高而降低。处理 1.5 h 时游离氨基酸含量以 37℃处理的最高,显著高于其他温度处理,33、41、45℃处理差异不显著。处理 6 h 时,33、37 和 41℃处理下的成虫体内游离氨基酸含量无显著差异。处理 12 h 时,41℃处理的游离氨基酸含量显著高于 37℃处理,与 33℃处理无显著差异(图 1)。



图中不同大写字母表示同一温度不同处理时间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示同一时间不同处理温度有显著性差异($P<0.05$)。下同
Different capital letters indicate significant differences ($P<0.05$) under the same temperature at different time points; different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) at different temperatures in the same time by Duncan's test. The same below

图 1 不同温度和不同时间下双斑长跗萤叶甲雌虫游离氨基酸的含量变化

Fig. 1 Contents of free amino acids in female adult *Monolepta hieroglyphica* exposed to different temperatures for different durations

2.2 高温胁迫下双斑长跗萤叶甲雌虫海藻糖含量的变化

在同一短时高温(33、37 或者 45℃)处理下,与对照温度(26℃)相比,双斑长跗萤叶甲雌虫体内的海藻糖含量均随处理时间延长而增加,并且处理时间越长上升幅度越大,而在 41℃处理下双斑长跗萤叶甲雌虫体内海藻糖含量先升高后降低再升高(图 2)。

试验中,双斑长跗萤叶甲雌虫在 45℃处理 2 h 后全部死亡。

在处理时间为 0.5、1.5、6 或者 12 h 时,双斑长跗萤叶甲雌虫体内的海藻糖含量均随处理温度的升高而增加,并且处理温度越高上升幅度越大,在处理时间为 2.5 h 时,双斑长跗萤叶甲雌虫体内的海藻糖含量随温度增加先升高后降低,但仍高于对照(图 2)。

耐热能力,以适应高温环境。

昆虫为维持其正常的生命活动,其血淋巴中的蛋白质、游离氨基酸等重要代谢物必须维持在一个较为恒定的水平。外界胁迫,如高温、低温、真菌侵入^[10]等都会导致免疫蛋白和防御酶类的合成,大量消耗了昆虫体内的游离氨基酸。由此推断,在高温条件下,双斑长跗萤叶甲雌虫体内可能合成大量免疫蛋白和防御酶类,导致游离氨基酸含量大幅度下降。

糖类是昆虫血淋巴的重要组分,是血淋巴贮存和运输能源物质的重要形式。昆虫血淋巴中最主要的糖类为海藻糖,占整个血淋巴中糖类含量的 80%~90%^[11]。海藻糖还能作为蛋白质稳定剂,以保护昆虫躲避热压力等恶劣环境^[12],能够在高温、高寒、干燥失水等恶劣的条件下在细胞表面形成特殊的保护膜,有效地保护生物分子结构不被破坏^[11]。随着温度的升高(33~35℃),双斑长跗萤叶甲成虫体内可溶性糖含量和海藻糖含量也随之上升,这与西伯利亚蝗的研究结果类似^[13],进一步说明双斑长跗萤叶甲成虫对短时高温具有很强的适应性。

新疆属高温干旱地区,双斑长跗萤叶甲成虫发生期正处于新疆高温时期,开展双斑长跗萤叶甲雌虫与短时高温之间关系的研究具有现实和生态意义。根据不同温度处理后双斑长跗萤叶甲的可溶性糖、游离氨基酸和海藻糖的变化趋势,综合分析得出,双斑长跗萤叶甲在 33~41℃下,均能正常生长,而且体内可溶性糖和海藻糖一直处于上升阶段,而对 45℃的高温也有一定的适应性。表明双斑长跗萤叶甲在高温胁迫下,通过不断积累体内抗逆物质

提高自身的耐热能力。这也预示着在新疆气候变暖趋势下,双斑长跗萤叶甲的发生仍会比较严重。本研究结果,为进一步研究高温对双斑长跗萤叶甲影响的生理机制奠定基础。

参考文献

- [1] 陈光辉,尹弯,李勤,等. 双斑长跗萤叶甲研究进展[J]. 中国植保导刊,2016,36(10):19-26.
- [2] 袁海滨,齐兴林,孙长东,等. 温度对水稻田双斑长跗萤叶甲种群发生动态的影响[J]. 吉林农业大学学报,2015,37(6):654-657.
- [3] 张聪,袁志华,王振营,等. 双斑长跗萤叶甲在玉米田的种群消长规律[J]. 应用昆虫学报,2014,51(3):668-675.
- [4] 张萌,崔娟,徐伟,等. 几种农作物寄主对双斑长跗萤叶甲成虫生殖力的影响[J]. 中国农学通报,2015(23):81-84.
- [5] 刘红霞. 新疆石河子总场棉花双斑萤叶甲的发生与防治[J]. 中国棉花,2016,43(2):41-42.
- [6] 陈静,张建萍,张建华,等. 双斑长跗萤叶甲的嗜食性研究[J]. 昆虫知识,2007,44(3):357-360.
- [7] 刘鑫,田岗,王枫叶,等. 谷田中双斑长跗萤叶甲种群动态初步研究[J]. 中国农学通报,2016,32(21):177-180.
- [8] 田径,崔娟,吴磊,等. 双斑长跗萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky)的药剂防治试验[J]. 农药,2014,53(10):767-770.
- [9] 李广伟,陈秀琳. 新疆棉区双斑长跗萤叶甲生活习性及其消长动态调查研究[J]. 中国植保导刊,2010,30(6):8-10.
- [10] 张慧,吴圣勇,王晓青,等. 球孢白僵菌对葱蝇成虫血淋巴蛋白质及游离氨基酸的影响[J]. 中国农业科学,2017,50(3):591-598.
- [11] 于彩虹,卢丹,林荣华,等. 海藻糖-昆虫的血糖[J]. 昆虫知识,2008,45(5):832-837.
- [12] WYATT G R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insect [J]. *Insect Physiology*, 1967, 4(4): 287-360.
- [13] 李娟,李爽,王冬梅,等. 高温胁迫下西伯利亚蝗体内抗逆物质含量变化[J]. 昆虫学报,2014,57(10):1155-1161.

(责任编辑:田 喆)

(上接 99 页)

- [12] DYRLOV B J, NIELSEN H H G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4):783-795.
- [13] 董娇,周军,辛培尧,等. 不同植物 LDOX/ANS 基因的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(5): 815-822.
- [14] GEOURJON C, DELEAGE G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Bioinformatics*, 1995, 11(6):681-684.
- [15] SHANMUGAM V. Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms [J]. *Microbiological Research*, 2005, 160(1):83-94.
- [16] KAJAVA A V, VASSART G, WODAK S J. Modeling of the

three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats [J]. *Structure*, 1995, 3(9):867.

- [17] 刘坤. 基于蛋白质序列信息预测二硫键的新方法研究[D]. 南京:南京理工大学,2017.
- [18] 王璐璐. 贵州地方油菜种质资源菌核病的抗性鉴定与评价[J]. 贵州农业科学,2014,42(4):42-46.
- [19] 晏立英,周乐聪,谈宇俊,等. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选和高效菌株的鉴定[J]. 中国油料作物学报,2005,27(2):55-57.
- [20] GOMATHI V, GNANAMANICKAM S S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence [J]. *Current Science*, 2004, 87(9):1211-1217.

(责任编辑:田 喆)