

柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的动态变化

周志雄, 袁江江, 李世香, 梁 玲, 李传仁*

(长江大学昆虫研究所, 荆州 434025)

摘要 柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 是我国西南和华中地区柑橘的主要害虫, 以滞育蛹在土壤中越冬。为探讨温度对柑橘大实蝇滞育蛹生理状态的影响, 本文测定了 12、16、20℃ 和 24℃ 下柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的变化。结果显示, 低温(12℃)下, 海藻糖酶活性逐渐上升, 高温(24℃)下, 海藻糖酶活性逐渐下降; 不同温度下山梨醇脱氢酶活性变化不尽相同, 在起始阶段(10 d 时), 柑橘大实蝇滞育蛹山梨醇脱氢酶活性普遍较强, 随滞育时间的延长, 酶活性出现不同的变化, 12℃ 和 20℃ 下, 山梨醇脱氢酶活性呈现“U”形变化趋势, 16℃ 下酶活性逐渐减弱, 24℃ 下酶活性先升后降。16℃ 下, 两种酶活性基本低于同时期其他温度处理。交互作用分析显示, 温度和化蛹后天数的交互作用对滞育蛹海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性存在显著影响。上述结果表明, 柑橘大实蝇自身生理状态应对不同越冬温度的反应不同, 说明越冬温度与柑橘大实蝇滞育期生理水平有着密切的关系。本研究结果对深入了解温度调控柑橘大实蝇滞育期代谢生理机制有一定的参考价值。

关键词 柑橘大实蝇; 滞育; 越冬温度; 海藻糖酶; 山梨醇脱氢酶

中图分类号: S 436.661, Q 965 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019241

Activity of trehalase and sorbitol dehydrogenase of the Chinese citrus fruit fly, *Bactrocera minax* (Enderlein) during diapause period

ZHOU Zhixiong, YUAN Jiangjiang, LI Shixiang, LIANG Ling, LI Chuanren*

(Institute of Entomology, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract *Bactrocera minax* (Enderlein) is an important citrus pest in southwestern and central China, which overwinters as pupae in diapause in the soil. To investigate the effects of overwintering temperature on the physiological state of the Chinese citrus fruit fly during diapause, the changes in the activity of trehalase and sorbitol dehydrogenase of the Chinese citrus fruit fly overwintering at 12, 16, 20 and 24℃ during diapause period were determined. The results showed that the activity of trehalase gradually increased at lower temperature (12℃), and decreased gradually at higher temperature (24℃). Under different overwintering temperatures, the activity of sorbitol dehydrogenase was different. At the initial stage of diapause (10 d), the activity of sorbitol dehydrogenase was generally higher. With the prolongation of days after pupation, the enzyme activity exhibited different changes. At 12℃ and 20℃, the activity of sorbitol dehydrogenase showed a “U” type change trend, and gradually decreased at 16℃, and rose and then dropped at 24℃. At 16℃, the activities of these two enzymes were basically lower than at other temperatures in the same time. Interactive analysis showed that temperatures and days after pupation had a significant effect on the activity of trehalase and sorbitol dehydrogenase of *B. minax* pupae in diapause. These results indicated that the physiological state of the Chinese citrus fruit fly had different responses to different overwintering temperatures, and the overwintering temperature was closely related to the physiological level of the Chinese citrus fruit fly during diapause period. The present work provides a reference for understanding the regulation of physiological metabolism of the Chinese citrus fruit fly in diapause by overwintering temperatures.

收稿日期: 2019-05-11 修订日期: 2019-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(31572010)

* 通信作者 E-mail: 13986706558@163.com

Key words *Bactrocera minax*; diapause; overwintering temperature; trehalase; sorbitol dehydrogenase

柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 俗称“柑蛆”，是我国西南和华中地区柑橘的主要害虫，能够严重影响柑橘果实的产量和品质^[1-3]。柑橘大实蝇为一化性昆虫，以专性滞育(化蛹后开始进入滞育状态)蛹在土壤中越冬，滞育期长达 4~5 个月，滞育解除后继续发育一个月左右，在翌年 4 月下旬至 5 月上旬成虫开始羽化，6 月中旬开始在柑橘果实中产卵，8 月中旬幼虫孵化后为害果实^[2-5]。

滞育是昆虫为了躲避不良环境而中止发育的一种适应行为^[6-7]，在滞育过程中昆虫以最经济的能量利用方式进行较缓慢的生命活动来度过漫长的滞育期。海藻糖和山梨醇是滞育昆虫体内存在的两种重要物质，作为昆虫的“血糖”，海藻糖既能作为能量物质来源，也能协助细胞抵御多种环境胁迫^[8-13]，昆虫体内唯一可以降解海藻糖的海藻糖酶能将一分子海藻糖分解成为两分子葡萄糖，再进一步通过糖酵解为昆虫提供能量^[14-16]。同样，山梨醇也能作为昆虫越冬期抗寒物质，在山梨醇脱氢酶的作用下转化成糖原，为昆虫滞育期提供能量。因此，海藻糖酶和山梨醇脱氢酶对昆虫滞育期能量代谢的调控起到极其重要的作用。迄今为止，对昆虫滞育研究的结果表明，昆虫体内海藻糖酶和山梨醇脱氢酶是其滞育起始和终止阶段的 2 个关键性酶^[17]。

研究表明，温度是影响柑橘大实蝇越冬存活的主要因子之一，温度过高(30℃以上)或过低(10℃以下)均不利于柑橘大实蝇蛹的存活和成虫的羽化^[5]，15~20℃是柑橘大实蝇越冬的适宜温区^[18]。为深入了解柑橘大实蝇越冬蛹在滞育过程中体内化学物质代谢变化规律，本文研究了柑橘大实蝇滞育蛹在 12、16、20℃和 24℃条件下越冬其体内海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的变化，为柑橘大实蝇越冬蛹滞育代谢生理机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2016 年 10 月初，从湖北松滋市温州蜜柑园采集落地蛆果，在实验室剥出落果中柑橘大实蝇幼虫。在采集供试虫源之前，先将河沙烘干，然后添加蒸馏水将河沙湿度调至 15%~20%，再将湿河沙盛于直径 20 cm 的花盆中；将柑橘大实蝇幼虫置于室内装有湿河沙的花盆中自然化蛹，每隔 2 d 检视花盆中

柑橘大实蝇的化蛹进度并捡出蛹，以前后 2 次捡出的蛹为同期蛹。

1.2 试验处理

以第 2 次捡出蛹的时间为起始点，选取两次化蛹、体型相近的同期滞育蛹 800 头，立即随机分成 4 组，按 50 头/盆分别置于 12、16、20℃和 24℃光照培养箱(L//D=14 h//10 h)中饲养，并保持花盆中河沙湿度在 15%~20%之间。在化蛹后 10、30、70 d 和 110 d 收集各温度处理下的滞育蛹 20 头，用蒸馏水冲洗干净，吸水纸吸干后称重。用液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存待测，但鉴于柑橘大实蝇蛹在 24℃条件下的滞育蛹期仅持续 50 d 左右，故该处理下仅收集化蛹 10、30 d 和 50 d 的样品。

1.3 柑橘大实蝇滞育相关酶活性测定

酶液的制备：取每处理越冬蛹，称量后于冰浴中迅速研磨，加 5 mL 预冷缓冲液。海藻糖酶的缓冲液为磷酸盐缓冲液(PBS, pH 5.8)，山梨醇脱氢酶的缓冲液为 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8，内含 Tris 0.2 mol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, NaN₃ 15 mmol/L)。样品在冰浴中匀浆，匀浆液于 4℃下 16 000 g (Eppendorf Centrifuge 5810 R) 离心 10 min，取上清液作为酶液^[19]。

海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性的测定分别参考李志刚等^[19]和 Negm 等^[20]的方法，采用紫外分光光度计(Beckman Coulter DU-730)分别在 550 nm 和 340 nm 测定吸光值。每处理重复 4 次。两种酶活性以每分钟每毫升反应液的吸光度变化值为活性单位(OD/(mL·min))。

1.4 数据处理

所有试验数据均采用 SPSS(SPSS Inc., Chicago, USA)数据处理系统进行分析。所得柑橘大实蝇滞育蛹两种酶活性数据进行单因素方差分析和双因素方差分析，平均数差异均采用 Tukey 法多重比较。

2 结果与分析

2.1 海藻糖酶活性的变化动态

温度和化蛹后天数综合作用下柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶活性如图 1 所示。温度和化蛹后天数对柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶活性均有显著影响，两因素交互作用也存在显著影响(表 1)。

表 1 温度和化蛹后天数对柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性影响的方差分析
Table 1 Analysis of variance for the effects of temperature and days after pupation on the activity of trehalase and sorbitol dehydrogenase of *Bactrocera minax* overwintering pupae

源 Source	海藻糖酶 Trehalase						山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase					
	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of squares	<i>df</i>	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>		Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of squares	<i>df</i>	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	
温度 Temperature	0.003	3	0.001	28.718	0.000		2.742	3	0.914	68.631	0.000	
化蛹后天数 Days after pupation	0.001	4	0.000	10.155	0.000		2.701	4	0.675	50.698	0.000	
温度×化蛹后天数 Temperature×Days after pupation	0.002	7	0.000	8.364	0.000		2.848	7	0.407	30.550	0.000	
误差 Error	0.001	35	0.000				0.413	31	0.013			
总计 Total	0.022	50					47.850	46				

在相同温度下,滞育蛹海藻糖酶活性随化蛹后天数而变化。在 12℃条件下,滞育蛹海藻糖酶活性随化蛹后天数逐渐增强,在 110 d 时活性最强;16℃下,海藻糖酶活性随化蛹后天数先增后减,在 30 d 时最高,110 d 时最低;20℃时,海藻糖酶活性在滞育期呈现升-降-升的变化模式,在 30 d 时酶活性达到最强,70 d 时活性最弱;24℃时,酶活性强度随化蛹后天数逐渐减弱,且 10 d 时酶活性显著强于 30 d 和 50 d,30 d 和 50 d 之间无显著差异(图 1)。

在相同滞育期,滞育蛹海藻糖酶活性随温度而不同。处理 10 d 后,海藻糖酶活性随温度升高先减后增,24℃下酶活性显著高于其他温度;处理 30 d 后,20℃下酶活性最高,显著高于 12℃和 16℃的酶活性;70 d 时,海藻糖酶活性随温度升高呈现降-升的变化趋势,16℃条件下酶活性最低,12、16 和 20℃之间酶活性无显著差异;110 d 之后,海藻糖酶活性随温度升高呈现降-升的变化趋势,在 16℃下酶活性显著低于 12℃和 20℃,12℃和 20℃之间无显著差异(图 1)。

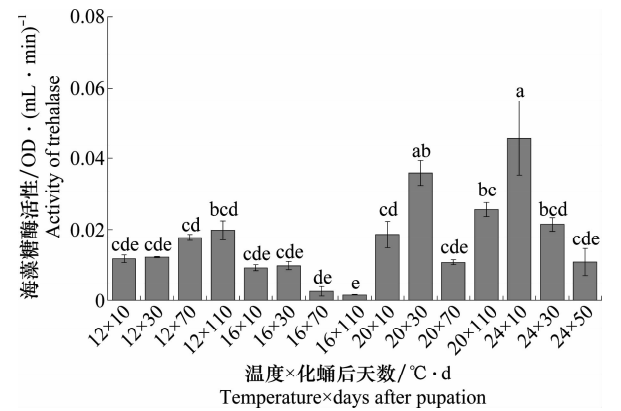


图 1 温度和化蛹后天数综合作用下柑橘大实蝇海藻糖酶活性
Fig. 1 Trehalase activity of *Bactrocera minax* overwintering pupae in response to the change of temperature and days after pupation

以温度和化蛹后天数作为单一因子分析后发现,不同温度条件比较,16℃条件下柑橘大实蝇滞育蛹海藻糖酶活性最低,显著低于 20℃和 24℃,24℃条件下酶活性最高(图 2a);化蛹后不同天数比较,70 d 时酶活性最低,且显著低于 10 d 和 30 d,10 d 时酶活性最高(图 2b)。

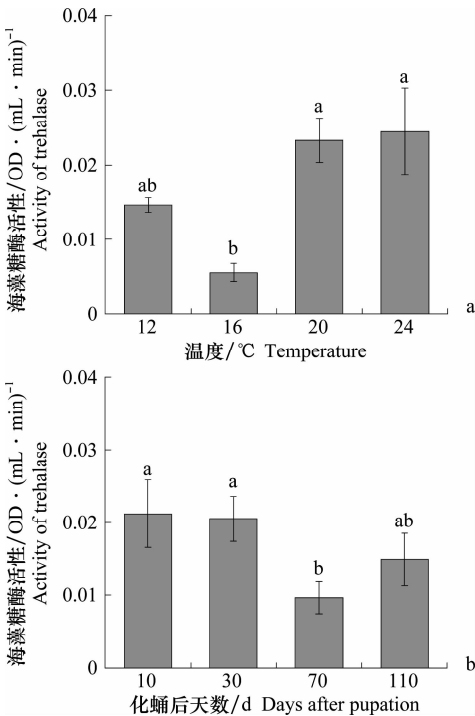


图 2 温度(a)和化蛹后天数(b)对柑橘大实蝇滞育期海藻糖酶活性的影响
Fig. 2 Effects of temperature (a) and days after pupation (b) on the activity of trehalase in *Bactrocera minax* during diapause period

2.2 山梨醇脱氢酶活性的变化动态

柑橘大实蝇滞育蛹山梨醇脱氢酶活性随温度和滞育期的变化动态如图 3 所示。温度和化蛹后天数

对柑橘大实蝇滞育蛹山梨醇脱氢酶活性均有显著影响,两因素交互作用也存在显著影响(表 1)。

在相同温度下,滞育蛹山梨醇脱氢酶活性随化蛹后天数而变化。由图 3 可见,不同温度下,随化蛹后天数增加,山梨醇脱氢酶活性变化趋势不同。12℃下,山梨醇脱氢酶活性基本维持不变,30 d 时酶活性最低,110 d 时酶活性最高;16℃下,30 d 之前酶活性无显著变化,30 d 后酶活性显著降低;20℃条件下,山梨醇脱氢酶活性随化蛹后天数呈现“U”形变化趋势,10 d 时活性最强,之后酶活性逐渐降低,70 d 时酶活性最低,随后缓慢增强;24℃时,滞育期酶活性呈倒“U”形变化,在 30 d 时酶活性最强。

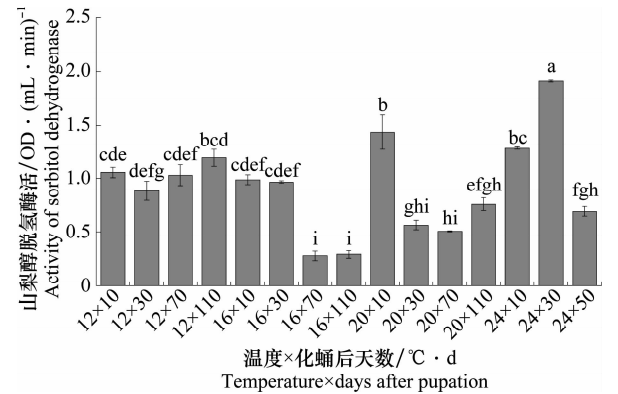


图 3 温度和化蛹后天数综合作用下柑橘大实蝇山梨醇脱氢酶活性

Fig 3 Activity of sorbitol dehydrogenase in *Bactrocera minax* overwintering pupae in response to the change of temperature and days after pupation

在相同滞育期,滞育蛹的山梨醇脱氢酶活性随温度变化而不同。处理 10 d 后,山梨醇脱氢酶活性强度顺序为 20℃>24℃>12℃>16℃,其中 20℃时活性显著高于 12℃和 16℃,12℃、16℃和 24℃之间无显著差异;30 d 后,20℃下酶活性最低,24℃下酶活性最高并显著高于 12℃、16℃和 20℃下的酶活性;处理后 70 d 和 110 d,16 和 20℃条件下滞育蛹山梨醇脱氢酶活性显著低于 12℃,且 16℃下酶活性最低,酶活性随温度升高呈现降-升的变化趋势。

以温度和化蛹后天数作为单因子分析结果如图 4 所示。16℃条件下滞育蛹山梨醇脱氢酶活性最低,显著低于 12、20℃和 24℃,24℃条件下酶活性最高(图 4a);不同时期中,70 d 时酶活性最低,且显著低于 10 d 和 30 d,10 d 时酶活性最高(图 4b)。

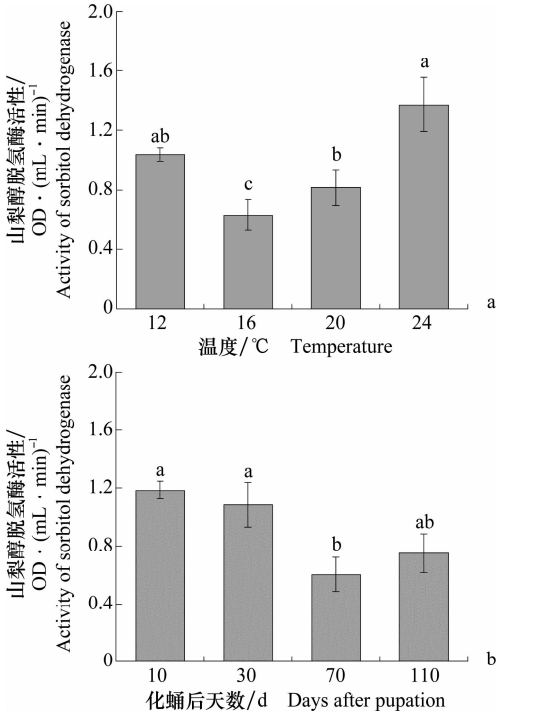


图 4 温度(a)和化蛹后天数(b)对柑橘大实蝇滞育期山梨醇脱氢酶活性的影响

Fig. 4 Effects of temperature (a) and days after pupation (b) on the activity of sorbitol dehydrogenase in *Bactrocera minax* during diapause period

3 讨论

在滞育期,昆虫主要通过消耗自身储存的能量物质来维持生命活动,作为昆虫的“血糖”,海藻糖在昆虫生命活动中发挥着极其重要的作用^[12]。本文测定了滞育期不同温度下柑橘大实蝇蛹海藻糖酶活性的变化。结果表明,不同温度下,海藻糖酶活性变化趋势不尽相同,在滞育起始阶段,海藻糖酶活性与温度呈正相关,处理 10 d 后,各温度下海藻糖酶活性变化趋势不同,说明柑橘大实蝇在滞育期应对不同恒温越冬条件的反应不同。在自然条件下,滞育期柑橘大实蝇海藻糖含量呈现升-降的变化趋势,且海藻糖酶活性变化也呈现升-降的趋势^[21],本研究中低温和高温越冬条件下,随化蛹后天数增加海藻糖酶活性分别逐渐升高和降低。因此,在柑橘大实蝇体内海藻糖含量的高低可能与海藻糖酶活性的变化并非呈现相关关系^[12,22],同时,作为抗寒物质,在柑橘大实蝇体内,海藻糖可能不是主要的抗寒物质,但海藻糖酶在滞育起始阶段之后的作用有待进一步研究。

山梨醇是生物体内重要的抗逆物质之一^[17]。大量研究表明,许多滞育昆虫体内山梨醇的含量变

化与其滞育的开始、维持和解除存在密切的关系^[23]。其能够催化山梨醇脱氢转化成糖原,而糖原是滞育昆虫重要的营养物质,因此,山梨醇脱氢酶在昆虫滞育中有着重要作用。本文研究结果表明,不同越冬温度条件下,滞育期蛹山梨醇脱氢酶活性变化趋势不尽相同。在滞育起始阶段(10 d 时),柑橘大实蝇越冬蛹体内山梨醇脱氢酶活性普遍较强,随化蛹后天数的增加,酶活性出现不同的变化,可能在滞育起始期,越冬蛹体内山梨醇被转化成其他物质来保证滞育开始的物质需求。10 d 之后,酶活性变化趋势不同,与滞育期温度无明显的相关性。

山梨醇脱氢酶作为滞育解除过程中的关键酶^[17],在滞育解除阶段,山梨醇在山梨醇脱氢酶的作用下转化成糖原,进而分解作为昆虫生长发育的能量物质。因此,在柑橘大实蝇越冬蛹的滞育后期可能会出现山梨醇脱氢酶活性上升的阶段。本文研究结果中,在 16℃ 和 24℃ 条件下,在滞育后期,山梨醇脱氢酶活性未出现上升的变化,并且在 12℃ 条件下,110 d 时酶活性未出现显著的上升。这一情况可能与柑橘大实蝇滞育解除时间有关,12℃ 和 16℃ 条件下越冬时,滞育解除时期可能在 110 d 之后,在 20℃ 下越冬,滞育解除期可能在 70~110 d 之间,而在 24℃ 下越冬时,滞育解除期可能在 30~50 d 之间,因此,在 12℃ 和 16℃ 条件下越冬 110 d 之后,山梨醇脱氢酶活性可能会出现显著上升。这与温度调控柑橘大实蝇越冬蛹的发育可能存在密切的关系。

本试验结果表明,在低温(12℃)和高温(20℃和 24℃)条件下越冬,柑橘大实蝇越冬蛹海藻糖酶和山梨醇脱氢酶活性基本高于同时期在 16℃ 下越冬个体,且在 16℃ 下,随滞育期的延长,虫体两种酶活性基本呈现逐渐下降的趋势,由此可以看出,在 16℃ 下越冬,越冬个体可能对海藻糖和山梨醇需求程度逐渐减弱,且可能在此条件下越冬,虫体会出现海藻糖和山梨醇的积累,同时为滞育解除后的发育提供能量保证。

参考文献

- [1] 陈世骧,谢蕴贞. 关于桔大实蝇的学名及其种征[J]. 昆虫学报, 1955,5(1):123-126.
- [2] 汪兴鉴,罗禄怡. 桔大实蝇的研究进展[J]. 昆虫知识, 1995,32(5):310-315.
- [3] 王小蕾,张润杰. 桔大实蝇生物学,生态学及其防治研究概况[J]. 环境昆虫学报, 2009,31(1):73-79.
- [4] 吴志清. 桔大实蝇的生活习性观察初报[J]. 昆虫知识, 1958, 4(5):216-217.
- [5] 罗禄怡,陈长风. 柑桔大实蝇蛹的生物学特性[J]. 中国柑桔,

- 1987,4(3):9-10.
- [6] DANKS H V. Insect dormancy:an ecological perspective. Biological survey of Canada (Terrestrial Arthropods) [M]. Ottawa:National Museum of Sciences,1987:114-122.
- [7] TAUBER M J,TAUBER C A,MASAKI S. Seasonal adaptations of insect [M]. Oxford:Oxford University Press, 1986:135-151.
- [8] CROWE J H,CROWE L M,CHAPMAN D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms—the role of trehalose [J]. Science,1984,223(4637):701-703.
- [9] BENAROUJ N,LEE D H,GOLDBERG A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals [J]. Journal of Biological Chemistry,2001,276(26):24261-24267.
- [10] FIELDS P G,FLEURAT-LESSARD F,LAVENSEAU L, et al. The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance,trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera) [J]. Journal of Insect Physiology,1998,44(10):955-965.
- [11] JAIN N K,ROY I. Effect of trehalose on protein structure [J]. Protein Science,2009,18(1):24-36.
- [12] THOMPSON S N. Trehalose-the insect ‘blood’ sugar [J]. Advances Insect Physiology,2003,31:205-285.
- [13] WEGENER G. Flying insects: model systems in exercise physiology [J]. Experientia,1996,52(5):404-412.
- [14] CHEN Jie,TANG Bin,CHEN Hongxin, et al. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference [J/OL]. PLoS ONE, 2010,5(4):e10133. DOI: 10.1371/journal.pone.0010133.
- [15] SHUKLA E,THORAT L J,NATH B B, et al. Insect trehalase: physiological significance and potential applications [J]. Glycobiology, 2015,25(4):357-367.
- [16] YANG Mengmeng,ZHAO Lina,SHEN Qida, et al. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. Pest Management Science,2017,73(1):206-216.
- [17] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展[J]. 昆虫学报,1999,42(1):100-107.
- [18] 柯勇. 柑桔大实蝇的越冬生物学研究[D]. 荆州:长江大学,2013.
- [19] 李志刚,韩诗畴,郭明昉,等. 取食不同食料植物对安婀珍蝶的营养利用及中肠四种酶活力的影响[J]. 昆虫学报, 2005,48(5):674-678.
- [20] NEGM F A,LOESCHER W H. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue [J]. Plant Physiology,1997,64(1):69-73.
- [21] 王佳,樊欢,熊才才,等. 柑橘大实蝇滞育和非滞育蛹体内海藻糖含量的调控[J]. 昆虫学报,2018,61(9):1010-1018.
- [22] KLOWDEN M J. Metabolic systems in physiological systems [M]. London:Academic Press,Elsevier Inc,2007:293-356.
- [23] AYYANGAR G S G,RAO P J. Changes in haemolymph constituents of *Spodoptera litura* (Fabr.) under the influence of azadirachtin [J]. Indian Journal of Entomology,1990,52(1):69-83.