

# 低温胁迫对异色瓢虫成虫存活及体内几种酶活力的影响

赵静<sup>1,2</sup> 李姝<sup>3</sup> 陈珍珍<sup>2</sup> 王甦<sup>3\*</sup> 许永玉<sup>2\*</sup>

(1. 潍坊科技学院, 山东 寿光 262700; 2. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018;  
3. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

**摘要:** 为探讨低温胁迫对异色瓢虫存活的影响以及冷伤害机制, 采用温度和时间双因子处理测定了低温暴露中异色瓢虫成虫的存活率及其体内4种酶活性变化。结果表明: 过冷却点以上的低温(-5、-7℃)就能导致异色瓢虫成虫大量死亡, 随着温度的降低和暴露时间的延长, 成虫存活率显著降低; 暴露在-1、-3、-5和-7℃下的半致死时间 $LT_{50}$ 分别为8.30、6.68、3.54和1.24 d, 且随着温度的降低,  $LT_{50}$ 显著降低。异色瓢虫成虫体内过氧化氢酶和过氧化物酶活性随着温度的降低及暴露时间的延长而明显升高, 在-10℃和-5℃下暴露10 d时活性达到最高, 分别为679.73 U/g和396.06 mg/mL; 而乳酸脱氢酶和 $Na^+$ 、 $K^+$ -ATP酶活性随着低温胁迫时间的延长而降低。表明低温下异色瓢虫成虫体内细胞保护酶系统的防御能力趋强而有利于增强低温抵抗力, 但会影响其体内代谢产物及离子运输, 长时间的低温胁迫甚至会引起代谢紊乱。

**关键词:** 异色瓢虫; 低温胁迫; 酶活力; 低温伤害

## Effects of cold stress on survival and activities of several enzymes in multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) adults

Zhao Jing<sup>1,2</sup> Li Shu<sup>3</sup> Chen Zhenzhen<sup>2</sup> Wang Su<sup>3\*</sup> Xu Yongyu<sup>2\*</sup>

(1. College of Weifang Science & Technology, Shouguang 262700, Shandong Province, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China; 3. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** In order to clarify the effects of cold stress on survival and the physiological mechanisms underlying chill injury, the survival rate at low temperatures under controlled laboratory conditions and the activities of several enzymes in the body of multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) were measured. The results showed that a great deal of death of *H. axyridis* adults occurred at temperatures above the mean of supercooling point (-5, -7℃). As temperature was lowered or exposure duration was prolonged, the survival rate significantly reduced. The  $LT_{50}$  values when exposed to -1, -3, -5 and -7℃ were 8.30, 6.68, 3.54 and 1.24 days, respectively, and significantly decreased with lowering temperature. In addition, the activities of two kinds of protective enzymes, superoxide dismutase and catalase, significantly increased as temperature was lowered or exposure duration was prolonged, which were the highest when exposed at -10℃ and -5℃ for 10 days (679.73 U/g and 396.06 mg/mL, respectively). However, the activity of lactate dehydrogenase related to the metabolism

基金项目: 国家“973”计划(2013CB127605), 山东省高等学校科技计划(J13LF54), 潍坊科技学院博士基金(W13K016)

作者简介: 赵静, 女, 1983年生, 讲师, 研究方向为天敌昆虫抗逆性及其释放应用, E-mail: zhjlovely@163.com

\* 通讯作者(Authors for correspondence), E-mail: xuyy@sdau.edu.cn, anthocoridae@163.com

收稿日期: 2013-12-20

and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase markedly decreased under chill injury. These results indicated that the cold stress could enhance the defense ability of protective enzyme system in the body of *H. axyridis* and increase their resistance to low temperature, but affected the transportation of metabolic product and ion, even resulted in metabolic disorder by long-time cold stress.

**Key words:** *Harmonia axyridis*; cold stress; enzyme activities; chill injury

低温胁迫是指超出正常变动范围的温度因子,常常会限制或者影响生物的生长发育、生存和生理功能,在某种程度上构成了生物有机体的选择压力和进化动力<sup>[1]</sup>。在低温环境中,昆虫体内的许多生物过程减缓甚至停止<sup>[2]</sup>,这种环境包括低温的强度、持续的时间及在结冰点上下波动的程度等<sup>[3]</sup>。在许多种类的昆虫中,冷伤害有时会在0℃以上。有研究表明在持续低温下,冷伤害累积可能影响许多生理过程,包括膜电位丢失、蛋白质合成受阻、离子调节失衡等<sup>[4-5]</sup>。昆虫暴露在低温下体内发生的生理生化过程很复杂,因此冷伤害机制仍然不是很清楚<sup>[6]</sup>。

在昆虫耐寒性研究中,过冷却点(supercooling point, SCP)常作为衡量耐寒性强弱的重要指标<sup>[7-8]</sup>,但是SCP以上的亚致死温度就可导致不耐结冰类昆虫的大量死亡,因而SCP不能作为耐寒性的唯一指标<sup>[9]</sup>。对于一种昆虫来说,其耐寒性强弱最终还是取决于其低温存活能力(cold survival capacity)。目前昆虫低温存活能力主要是通过实验室低温存活试验确定,这在许多种类的昆虫研究中都曾应用过<sup>[10-11]</sup>,因此有着非常重要的生态学意义,如可用于预报害虫越冬期间的死亡情况以及外来物种能否在引入地成功建立种群<sup>[12-13]</sup>;同时,还可以预报昆虫不同地理种群对气候变化的反应及其是否能成功越冬<sup>[2]</sup>。

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 属鞘翅目瓢虫科,对蚜虫、叶螨等多种农林害虫具有很强的捕食能力,是一种重要的生防天敌<sup>[14-15]</sup>。在自然界环境中,异色瓢虫以成虫滞育越冬,由于气候的季节性变化,每年都遭受着不同程度的低温伤害,影响其来年在田间的分布和种群数量。关于异色瓢虫在低温下适应机制的研究已有报道,如滞育的发生<sup>[16]</sup>、SCP及体内含水量的降低<sup>[17]</sup>、体内脂肪含量和小分子抗冻保护物质的累积等<sup>[18-19]</sup>。本研究通过一系列实验室低温存活试验以明确低温胁迫对异色瓢虫成虫存活能力的影响,并测定了低温暴露中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,

LDH)及 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP酶的活性,以期阐明影响其越冬存活的关键因素,进一步探讨低温伤害的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试虫源:异色瓢虫采自山东省泰安市郊区桃园内(36°15' N, 116°59' E),挑选健康成虫引入养虫笼(35 cm × 40 cm × 50 cm)内饲养,每笼20~30头,在笼内放置带有足量豆蚜 *Aphis curviness* Koch 的蚕豆苗,且每48 h更换一次。待雌雄成虫交配产卵后,取出带有新鲜卵块的蚕豆叶片移入洁净的玻璃培养皿中,卵孵化后转移至另一养虫笼内继续饲养至成虫羽化。饲养期间为降低幼虫自残行为的发生,每笼内80~100头幼虫,且每48 h更换一次蚕豆苗。人工气候室环境条件参数分别为温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度(70 ± 5)%、光周期 16 L : 8 D。室内异色瓢虫种群均饲养2代以上用于试验。

试剂:CAT、SOD、LDH和 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP酶活性试剂盒均购自南京建成生物工程公司。

仪器:BCD-219SKDC型低温冰箱,青岛海尔股份有限公司;SCR20BC型日立高速冷冻离心机,日立工机株式会社;UV-2450可见分光光度计,日本岛津公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 恒定低温下异色瓢虫存活能力测定

将异色瓢虫成虫进行温度和时间双因子的处理。首先测定成虫的SCP(-9℃左右),初步确定致死温度。根据预试验设置4个温度梯度:-1、-3、-5、-7℃;5个时间梯度:1、3、5、7、9 d。挑选羽化10 d左右的健康成虫(体型大小均一,♀:♂ = 1:1)移入直径9 cm塑料培养皿中,皿口覆盖封口膜并用解剖针扎取若干通气孔,分别在-1、-3、-5、-7℃低温冰箱中暴露1、3、5、7、9 d。低温暴露中成虫处于冷昏迷状态不能取食,所以无需饲喂蚜虫。低温处理结束后将成虫转移至正常饲养条件下恢复24 h,以能协调行走的作为存活标准,计算成虫存活率。每处理3次重复,每重复30头试虫。

### 1.2.2 低温胁迫下异色瓢虫体内酶活性测定

挑选体型大小均一的健康成虫(♀:♂ = 1:1)置于试管内,并用纱布封口。将成虫分别在 5、0、-5、-10℃ 下暴露 1、3、5、10、30 d。每处理 10 头成虫,重复 3 次。将饲养在 25℃ 下的成虫作为对照。体内酶活力测定参照 Jing 等<sup>[20]</sup> 方法。异色瓢虫经以上不同处理后准确称量 10 头成虫,按重量体积比 1:9 加预冷的生理盐水在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆,制备 10% 组织匀浆,取 0.4~0.5 mL 于 1.5 mL 离心管中 1000 r/min 离心 5 min,用于检测 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活性,剩余组织匀浆于 1.5 mL 离心管中 3000 r/min 离心 15 min,用于检测 CAT、LDH 和 SOD 活性。离心后转移上清,弃沉淀,再用预冷生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆,-20℃ 保存备用。

采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,以每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位;采用紫外分光光度法测定 CAT 活力,以每克组织蛋白中 CAT 每秒分解吸光度为 0.50~0.55 底物中的过氧化氢相对量为 1 个 CAT 活力单位;采用定磷法测定 ATP 酶活力,以每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解产生 1 μmol 无机磷的量为 1 活力单位;采用 2,4-二硝基苯肼法测定 LDH 活力,以每克组织蛋白 37℃ 与基质作用 15 min,在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 活力单位。

### 1.3 数据分析

利用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用双因素方差分析法分析温度和暴露时间对异色瓢虫成虫存活率的影响;利用线性回归分析异色瓢虫成虫在低温胁迫下的半致死时间 LT<sub>50</sub>;对不同处理间差异进行单因素方差分析。应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温胁迫对异色瓢虫存活能力的影响

随着温度的降低和暴露时间的延长,异色瓢虫成虫存活率逐渐降低(图 1)。双因素方差分析表明,温度和暴露时间对异色瓢虫成虫的存活率影响显著(时间: $F = 102.567, df = 4, P < 0.01$ ;温度: $F = 106.912, df = 3, P < 0.01$ ;温度×时间: $F = 3.936, df = 12, P < 0.01$ )。异色瓢虫成虫暴露在较温和的低温(-1、-3℃)下其存活率无显著差异;当成虫暴露在-5℃下 1、3、5 d 时,其存活率分别为 80.0%、53.3% 和 26.7%,9 d 后其存活率几乎为 0;而成虫暴露在-7℃下 1、3、5 d 时,其存活率分别为 63.3%、46.7% 和 15.6%,下降更为剧烈。线性回归分析表明异色瓢虫成虫暴露在-1、-3、-5 和-7℃ 下的半致死时间 LT<sub>50</sub> 分别为 8.30、6.68、3.54 和 1.24 d。且随着温度的降低,LT<sub>50</sub> 显著降低( $F = 24.700, df = 3, P < 0.001$ )。

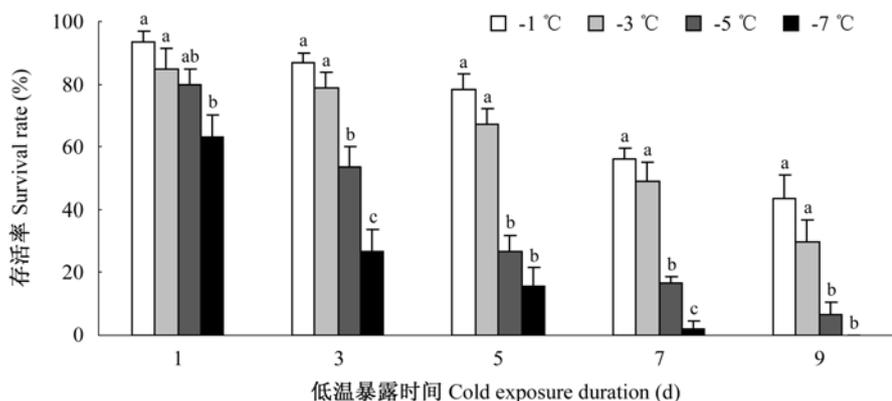


图 1 低温胁迫对异色瓢虫成虫存活率的影响

Fig. 1 Effects of cold stress on survival rate of *Harmonia axyridis* adults

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经 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 ± SE. Different letters on the bars indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

### 2.2 低温胁迫对异色瓢虫体内酶活力的影响

低温胁迫下异色瓢虫成虫体内 2 种细胞保护酶 CAT 和 SOD 表现出相似的变化趋势,在较温和低温下(0℃ 和 5℃)暴露 5 d 时 CAT 和 SOD 活性升高不明显,随着胁迫温度的降低及暴露时间的延长 2 种酶

活性明显升高(图 2)。CAT 和 SOD 在低温暴露 10 d 时活性达到最高,分别为 679.73 U/g 和 396.06 mg/mL,之后 2 种酶活性均降低。低温胁迫下成虫体内与新陈代谢有关的 LDH 和 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活性发生明显变化,随着胁迫时间的延长 LDH 活性先降低

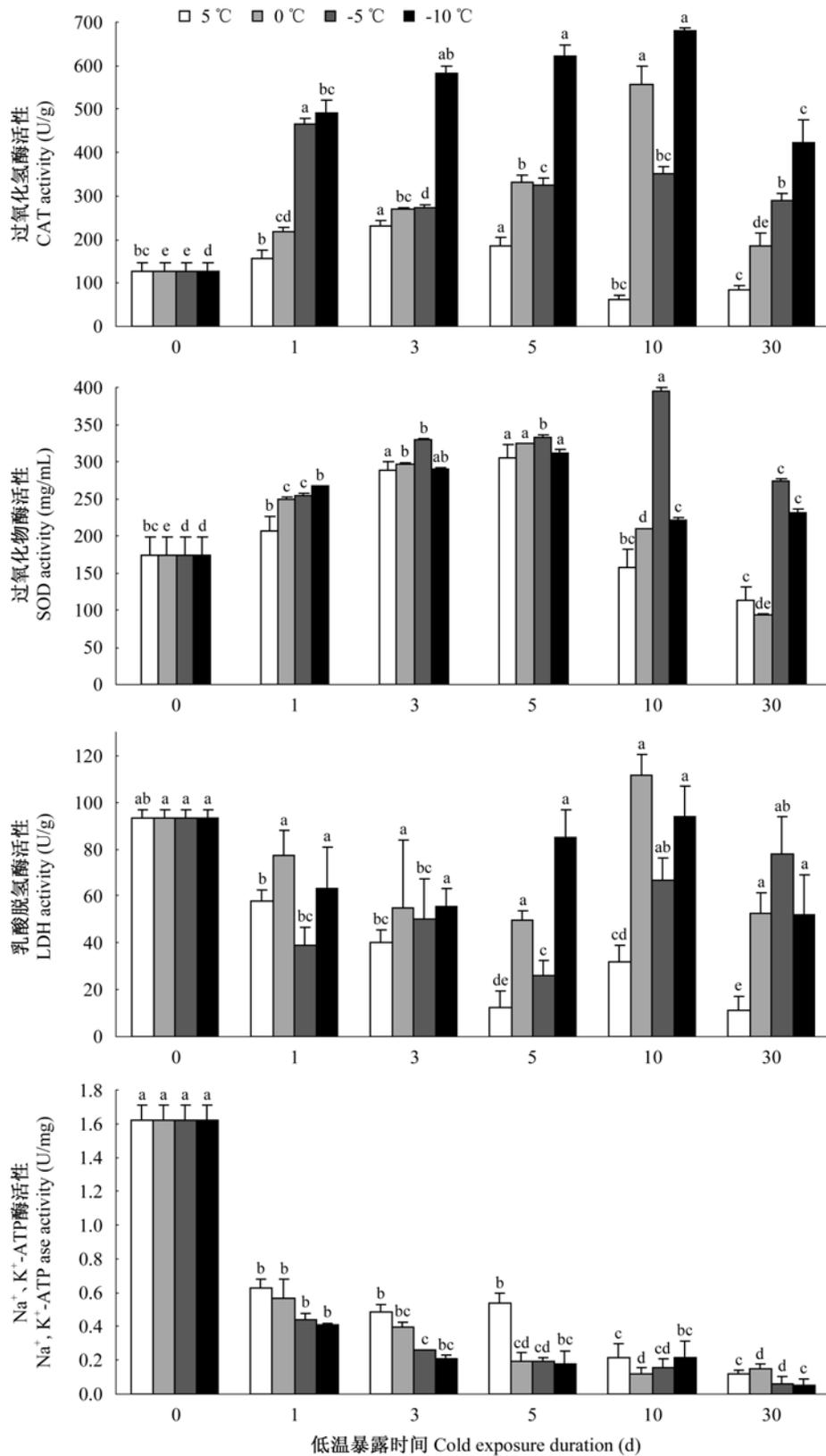


图2 低温胁迫对异色瓢虫成虫体内4种酶活性的影响

Fig. 2 The effect of cold stress on the activity of four enzymes in *Harmonia axyridis* adults

图中数据为平均数 ± 标准误。柱上不同小写字母表示经 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 ± SE. Different letters on the bars indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

后升高,而 ATP 酶活性持续降低。暴露在 5、0、-5 和 -10 °C 下 1 d 时,LDH 和 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活性显著降低( $F = 5.677, df = 4, P < 0.05$ ;  $F = 73.227, df = 4, P < 0.01$ ),而低温暴露 10 d 时 LDH 活性升高,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活性却一直降低(图 2)。

### 3 讨论

一些低温生物学家评价昆虫的耐寒性时,非常重视低温持续时间和低温强度的关系<sup>[2]</sup>。本试验将异色瓢虫成虫进行不同温度梯度和时间的交叉处理,双因素方差分析表明低温和暴露时间对成虫的存活率均存在显著影响,这说明异色瓢虫在低温下的存活受到时间和温度的交互作用。有多种数学模型可以模拟昆虫低温存活率和时间-温度的关系,Nedvĕd 等<sup>[21]</sup>以低温伤害的累积(sum of injury)(包括时间和温度)、低温伤害的上限(upper limit of cold injury)等为参数,利用逻辑斯蒂回归模型(logistic regression)对耐寒性进行了定量表达,这一模型与多种昆虫在低温下存活率的数据吻合。而本研究利用线性回归也能很好地分析出异色瓢虫成虫暴露在不同温度下的半致死时间,且成虫的 LT<sub>50</sub>随着温度的降低也显著降低。尽管可以通过建立模型很好地预测昆虫在恒定温度下的存活率,但是应用于实际工作中还要考虑很多复杂的因素。因此,还需综合考虑各种因素建立一个更加全面的低温暴露模型进行昆虫耐寒性的评价<sup>[22]</sup>。

昆虫长期暴露在持续低温下会直接影响其体内许多生理过程和组织结构,例如新陈代谢紊乱、离子调节失衡及膜脂相变等,这些都是导致低温伤害的原因<sup>[23-24]</sup>。早期研究表明细胞膜系统是低温冷害作用的首要结构部位,低温下昆虫体内积累大量有毒代谢废物,如乳酸、含氮废物、自由基等<sup>[25]</sup>,当浓度超过阈值时就会造成新陈代谢紊乱。SOD 与 CAT 能够清除细胞内的活性氧、羟自由基及其它过氧化物,以免对细胞造成毒害,具有保护细胞膜结构和功能完整的作用。研究表明昆虫体内也存在着由 SOD 与 CAT 组成的保护酶系,对昆虫的生长发育、代谢活动以及抗逆性具有重要意义<sup>[26]</sup>。在正常的生理情况下,生物体内自由基的产生和清除之间处于平衡状态。本试验中,在较温和的低温下(0 °C 和 5 °C),异色瓢虫成虫体内 SOD 与 CAT 活性升高,表明成虫体内细胞保护酶系统的防御能力趋强,这是虫体在低温下为保护细胞免受损伤而做出的生理适

应,有利于维持体内代谢废物产生和清除之间的平衡。但是持续遭受更严重的低温胁迫时(-5 °C 和 -10 °C),体内代谢废物的产生明显增加,而清除却下降,造成大量累积,当其浓度累积超过阈值时,就会造成膜脂过氧化,进一步引起新陈代谢紊乱。LDH 是糖酵解途径的关键酶之一,活性升高会直接影响到体内能量代谢,产生更多的能量用于新陈代谢;Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶有促进离子运输的重要功能,低温胁迫使细胞内外离子调节失衡。低温暴露过程中,异色瓢虫成虫体内 LDH 和 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活性明显降低,这有利于增强其低温抵抗能力,但是会影响体内代谢产物及离子运输,长时间的低温胁迫会进一步引起代谢紊乱。

除了涉及到酶系统的改变外,研究发现低温还能够诱导抗冻保护剂,如甘油、海藻糖、多元醇等的累积<sup>[27]</sup>;诱导胞外液体结冰的冰核剂以及阻止冰晶形成的抗冻蛋白,如热激蛋白 Hsp20.5、Hsp70 和 Hsp90 的出现等<sup>[28]</sup>。这些抗冻保护物质与体内一系列相关的酶系统是如何作用来增强昆虫的耐寒性尚需进一步研究。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] 康乐. 环境胁迫下的昆虫-植物的相互关系. 生态学杂志, 1995, 14(5): 51-57
- [2] Sinclair B J, Vernon P, Klok C J, et al. Insects at low temperatures: an ecological perspective. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(5): 257-262
- [3] Bale J S, Worland M R, Block W. Effect of summer frost exposures on the cold tolerance strategy of a sub-Antarctic beetle. Journal of Insect Physiology, 2001, 47(10): 1161-1167
- [4] Šlachta M, Berková P, Vambera J, et al. Physiology of the cold acclimation in non-diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). European Journal of Entomology, 2002, 99(2): 181-187
- [5] Košťál V, Vambera J, Bastl J. On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. The Journal of Experimental Biology, 2004, 207(9): 1509-1521
- [6] Košťál V, Yanagimoto M, Bastl J. Chilling-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2006, 143(2): 171-179
- [7] Chen B, Kang L. Cold hardiness and supercooling capacity in the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis*. Cryo Letters, 2002, 23(3): 173-182

- [8] Colinet H, Renault D, Hance T, et al. The impact of fluctuating thermal regimes on the survival of a cold-exposed parasitic wasp, *Aphidius colemani*. *Physiological Entomology*, 2006, 31(3): 234–240
- [9] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性研究. *生态学报*, 2002, 22(12): 2202–2207
- [10] Sømme L. The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *European Journal of Entomology*, 1999, 96(1): 1–10
- [11] Renault D, Salin C, Vannier G, et al. Survival at low temperatures in insects; what is the ecological significance of the supercooling point? *Cryo Letters*, 2002, 23(4): 217–228
- [12] Hart A J, Bale J S, Tullet A G, et al. Effects of temperature on the establishment potential of the predatory mite *Amblyseius californicus* (Acari: Phytoseiidae) in the UK. *Journal of Insect Physiology*, 2002, 48(6): 593–599
- [13] Hatherly I S, Bale J S, Walters K F A, et al. Thermal biology of *Typhlodromus montdorensis*: implications for its introduction as a glasshouse biological control agent in the UK. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2004, 111(2): 97–109
- [14] Koch R L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 2003, 3: 32<sup>#</sup>
- [15] 王甦, 张润志, 张帆. 异色瓢虫生物生态学研究进展. *应用生态学报*, 2007, 18(9): 2117–2126
- [16] Sakurai H, Kawai T, Takeda S. Physiological changes related to diapause of the lady beetle, *Harmonia axydis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 1992, 27(4): 479–487
- [17] 赵静, 于令媛, 李敏, 等. 异色瓢虫成虫耐寒能力的季节性变化. *昆虫学报*, 2008, 51(12): 1271–1278
- [18] Watanabe M. Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 2002, 99(1): 5–9
- [19] Koch R L, Carrillo M A, Venette R C, et al. Cold hardiness of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 2004, 33(4): 815–822
- [20] Jing X H, Wang X H, Kang L. Chill injury in the eggs of the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae): the time-temperature relationship with high-temperature interruption. *Journal of Insect Science*, 2005, 12(3): 171–178
- [21] Nedvĕd O, Lavy D, Verhoef H A. Modelling the time-temperature relationship in cold injury and effect of high temperature interruptions on survival in a chill-sensitive collembolan. *Functional Ecology*, 1998, 12(5): 816–824
- [22] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价方法. *昆虫知识*, 2004, 41(1): 7–10
- [23] Zachariassen K E, Kristiansen E, Pedersen S A. Inorganic ions in cold hardiness. *Cryobiology*, 2004, 48(2): 126–133
- [24] Overgaard J, Sørensen J G, Petersen S O, et al. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(11): 1173–1182
- [25] Rojas R R, Leopold R A. Chilling injury in the housefly: evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. *Cryobiology*, 1996, 33(4): 447–458
- [26] 薛芳森, 魏洪义, 朱杏芬. 黑纹粉蝶滞育蛹体内过氧化氢酶活力的研究. *植物保护学报*, 1997, 24(3): 204–208
- [27] Slachta M, Berková P, Vambera J, et al. Physiology of the cold acclimation in non-diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology*, 2002, 99(2): 181–187
- [28] Wang H S, Zhou C S, Guo W, et al. Thermoperiodic acclimations enhance cold hardiness of the eggs of the migratory locust. *Cryobiology*, 2006, 53(2): 206–217

(责任编辑:李美娟)