

白蜡虫不同虫态及不同地理种群 越冬雌成虫过冷却点的研究*

杨 璞, 陈晓鸣**, 谢正华, 刘魏魏

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:对昆明地区白蜡虫不同虫态的过冷却点进行了测定,结果表明:昆明地区雄虫真蛹期过冷却点最低,中值为 $-15.81\text{ }^{\circ}\text{C}$,符合正态分布;雌虫越冬时期过冷却点最低,中值为 $-20.41\text{ }^{\circ}\text{C}$,符合正态分布;对于不同地理种群白蜡虫越冬雌成虫过冷却点的测定表明,长春地区越冬雌成虫在3月份过冷却点显著低于其它地区,过冷却点中值为 $-23.19\text{ }^{\circ}\text{C}$,不符合正态分布。测定结果表明:白蜡虫在严寒地区抗寒能力增强。

关键词:白蜡虫;过冷却点;地理种群;抗寒;中值

中图分类号:S899.1

文献标识码:A

Studies on the Supercooling Point of *Ericerus pela* at Different Instars and Overwintering Female Adults of Different Geographic Populations

YANG Pu, CHEN Xiao-ming, XIE Zheng-hua, LIU Wei-wei

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The supercooling points (SCP) of *Ericerus pela* in different instars and geographic populations were determined. The results showed that true pupa stage of males of Kunming population had the lowest SCP (median: $-15.81\text{ }^{\circ}\text{C}$), which followed by a normal distribution. The overwintering stage of females had the lowest SCP (median: $-20.41\text{ }^{\circ}\text{C}$), which followed by a normal distribution. Analysis of SCP for different geographic populations of *E. pela* showed that, the overwintering individuals collected from Changchun in March had the lowest SCP (median: $-23.19\text{ }^{\circ}\text{C}$), but did not followed by a normal distribution. The results implied that the improvement of cold tolerance in *E. pela* through reducing SCP may enable this species to establish populations in severe cold area.

Key words: *Ericerus pela*; supercooling points; geographic populations; cold tolerance; median

昆虫是变温动物,极端的高温或低温均会影响其正常生活,尤其在不良的低温环境中,昆虫耐寒性的高低是其种群存在与发展的重要前提,决定着它们的生殖、扩散、分布及在下一季节的发生动态^[1]。对于任何机体细胞而言,细胞内结冰都是致命的,因

此,在大量的昆虫抗寒性研究中,过冷却点(supercooling point, SCP,是指水溶液或各种含水系统在冰点以下维持液态的物理现象,是大多数昆虫能避免结冰造成的死亡而做出的适应性调节)作为一个重要的指标来界定昆虫耐寒性的强弱,不少研究人员

收稿日期:2011-02-27

基金项目:云南省应用基础研究基金(2010ZC235);国家自然科学基金委青年基金(31000983)和中国林科院资源昆虫研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(7-015-3)

作者简介:杨 璞(1979—),男,博士,助理研究员,主要从事白蜡虫分子生物学研究. E-mail: zjyangpu@yahoo.cn.

* 致谢:吉林农业大学植保系硕士生戴鹏、四川峨眉川主乡沈跃如帮助采集白蜡虫标本,本单位科研助理杨红燕、文灿、刘平帮助测定过冷却点,在此表示感谢!

** 通讯作者.

还将过冷却点整合到在地理种群分布范围、入侵扩散等方面的研究,探讨昆虫过冷却点变化对种群繁衍、扩散的生态学意义^[2-9]。

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavanness), 属半翅目 (Hemiptera) 蚧总科 (Coccoidea) 白蜡蚧属 (*Ericerus*), 是我国特产资源昆虫, 所分泌的白蜡广泛应用于化工、医药、食品、化妆品等行业^[10]。在我国从 85°08' E 到 121°23' E, 18°N 到 42°N, 海拔 5 m 到 3 000 m 左右的广大地区均有白蜡虫分布。2006 年在吉林长春 (125°35' E, 43°88' N) 也首次发现了白蜡虫^[11]。至此, 在最冷月平均气温 -10.2 °C, 极端最低气温 -31.0 °C 的严寒地带仍有白蜡虫自然种群存在, 且雌雄虫生长发育正常, 能大量繁殖后代, 说明该虫对低温具有极不寻常的适应能力。目前, 对该虫的生活史等虽有很多研究^[10, 12], 但尚未有该虫耐寒性方面的相关报道。由于白蜡虫过冷却点的测定对于研究其地理分布特征具有重要意义, 因此, 本文对昆明地区白蜡虫不同虫态的过冷却点进行了测定分析, 同时选取了北亚热带的昆明、温带的峨眉以及北温带的长春三个地理种群的越冬雌成虫, 对其过冷却点进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试白蜡虫虫源分别采自云南省昆明市 (白蜡虫传统产虫区之一, 25°02' N, 102°42' E)、四川省峨眉市 (白蜡虫传统产蜡区之一, 29°30' N, 103°20' E) 和吉林省长春市 (目前文献报道白蜡虫分布最北端), 采集后即在实验室进行过冷却点测定。其中, 昆明地区的虫源先后采集于 2010 年 1 月—2011 年 3 月, 各虫态分别为雄虫的 1 龄、2 龄、前蛹和真蛹以及雌虫的 1 龄、2 龄和成虫; 峨眉市的虫源采集于 2011 年 1 月, 虫态为越冬雌成虫; 长春地区由于该虫越冬时间很长, 故在 2011 年 1 月和 3 月分别对该虫越冬雌成虫进行了 2 次采样。

1.2 过冷却点测定

白蜡虫过冷却点的测定使用过冷却点测定仪 (由北京鹏程电子组装并编写软件)。该测定仪主要由温度探头、数据采集器和电脑组成, 温度探头为热敏电阻, 感应的温度传输到数据采集器, 数据采集器每 1.7 s 采集 1 次数据, 采集到的数据通过数据线传输到电脑, 由过冷却点测定仪系统软件 (V1.2) 记录数据并做出温度变化曲线。

在测定时, 由于白蜡虫幼虫期个体很小, 单头无法进行测定, 故幼虫过冷却点测定时, 选取同一叶片/枝条上的龄期相同的幼虫约 30 头, 将这些虫子用 parafilm 膜小心的包住并轻轻缠在温度探头上, 重复测量 3 次 (1 龄雄虫和 2 龄雌虫重复测量多次后只测出 2 次); 对于体型较大的虫态, 如蛹和成虫, 选取单头个体用 parafilm 膜将其轻轻缠在温度探头上, 至少测量 20 头。在上述操作过程中, 保证供试虫体完整和健康, 不损伤虫体。在虫体与探头固定好后, 在其外面进一步用棉花包裹, 然后放入 -76 °C 超低温冰箱, 使虫体温度缓慢下降。放入冰箱前须运行过冷却点测定仪系统软件, 采集温度数据, 并由电脑记录数据。随着温度下降, 虫体细胞溶液从液态转变成固态, 释放潜热, 温度骤然上升, 温度变化曲线出现峰值跳跃, 拐点温度就是过冷却点。

1.3 数据分析

将获得的过冷却点数据导入 DPS 数据处理系统软件 (9.50 版), 对过冷却点的频次分布作图, 并由卡方检验判断数据是否符合正态分布。选取软件菜单栏“数据分析”中的“次数分布”作图并计算卡方值和 P 值, 如 $P > 0.05$ 即符合正态分布^[13]。由于过冷却点数据多不符合正态分布 (雄虫前蛹和真蛹期及昆明地区越冬雌成虫过冷却点数据符合正态分布, 但其它虫态以及不同地理种群过冷却点数据不符合正态分布), 故采用 DPS 中“非参数检验”下的“Wilcoxon 检验”对各个样本分别进行两两比较^[13]。各组数据分别取中值作柱状图表示。

2 结果与分析

2.1 昆明白蜡虫雄虫和雌虫不同虫态过冷却点 (SCP) 的变化

昆明地区白蜡虫雄虫 SCP 测定结果表明: 1 龄和 2 龄幼虫测量采用多个虫子混合测量, SCP 分布较为集中, 1 龄幼虫个体 SCP 范围在 -11.01 ~ -11.90 °C, 2 龄 SCP 范围在 -11.41 ~ -13.43 °C, 中值分别为 -11.46、-12.10 °C (图 1)。前蛹期和真蛹期采用单个个体测量, 个体 SCP 的分布范围较宽, 其中, 前蛹期 SCP 范围在 -9.29 ~ -16.03 °C 间, 最低值和最高值相差接近 7 °C, 中值为 -13.47 °C (图 1), 符合正态分布 ($\chi^2 = 10.85$, $df = 8$, $P = 0.2105$) (图 2A); 真蛹 SCP 分布在 -8.88 ~ -18.31 °C 间, 最低值和最高值相差接近 10 °C, 中值为 -15.81 °C (图 1), 符合正态分布 ($\chi^2 = 15.60$,

$df=9, P=0.0758$) (图2B)。Wilcoxon 分析进一步表明:真蛹期的 SCP 显著低于1龄、2龄幼虫期和前蛹期的 SCP, 而1龄和2龄幼虫期 SCP 没有显著差异, 2龄幼虫期 SCP 与前蛹期相比无显著差异, 但1龄幼虫期 SCP 与前蛹期存在显著差异(表1)。

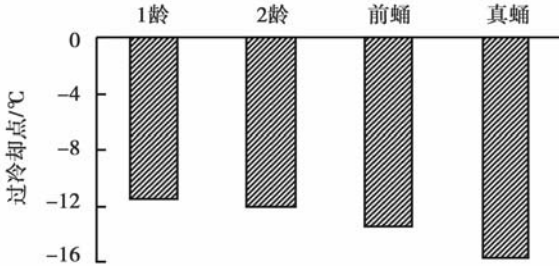


图1 白蜡虫雄虫不同虫态过冷却点的变化

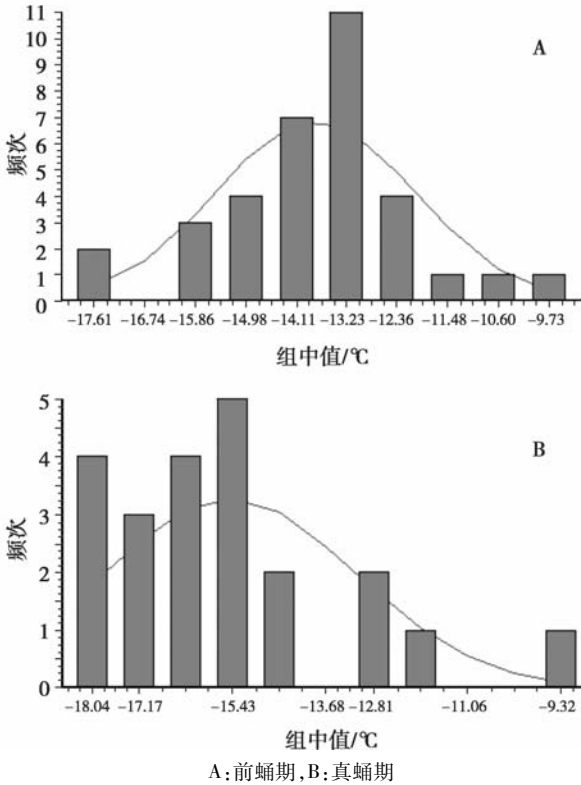


图2 白蜡虫雄虫前蛹期和真蛹期过冷却点的频次分布

表1 白蜡虫雄虫不同虫态过冷却点多重比较结果

比较组	样本数1	样本数2	U 值	P 值
1龄—2龄	2	3	0.866 0	0.386 5
1龄—前蛹	2	34	2.072 1	0.038 3 **
1龄—真蛹	2	22	1.932 7	0.053 3 *
2龄—前蛹	3	34	1.585 9	0.112 8
2龄—真蛹	3	22	2.132 8	0.032 9 **
前蛹—真蛹	22	34	3.279 9	0.001 0 ***

注:与其它虫态差异均显著的虫态黑体显示, * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

昆明白蜡虫雌虫 SCP 的测定结果表明:1龄和2龄幼虫测量方法与雄虫的相同,个体 SCP 分布范围较集中,分别为 $-9.54 \sim -13.61$ °C 和 $-13.45 \sim -14.21$ °C 间,中值分别为 -13.61 、 -13.83 °C (图3)。雌成虫越冬期和越冬后个体 SCP 的测定也采用单个个体,个体 SCP 的分布范围相比雄虫蛹期的则更宽,雌成虫越冬期 SCP 为 $-10.28 \sim -26.28$ °C,最低值和最高值相差 16 °C,中值为 -20.41 °C (图3),符合正态分布($\chi^2 = 23.70, df = 16, P = 0.0964$) (图5A);而越冬后雌成虫 SCP 虽有回升,SCP 在 $-5.55 \sim -14.83$ °C 间,但 SCP 最低值和最高值也相差 10 °C,中值为 -10.31 °C (图3),不符合正态分布($\chi^2 = 22.28, df = 9, P = 0.0080$) (图4)。Wilcoxon 分析进一步表明:越冬雌成虫 SCP 要显著低于1龄、2龄幼虫期和越冬后个体的 SCP,而1龄和2龄幼虫期 SCP 没有显著差别,但越冬后雌成虫的 SCP 显著高于2龄幼虫期(表2)。

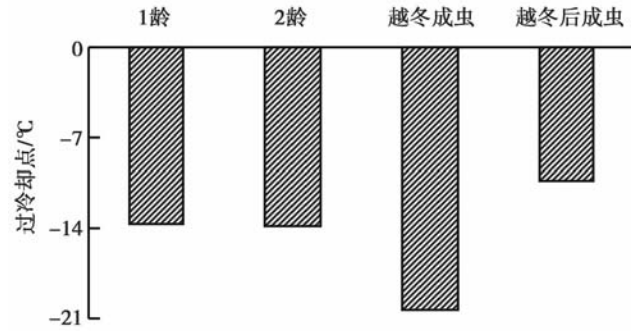


图3 白蜡虫雌虫不同龄期过冷却点的变化

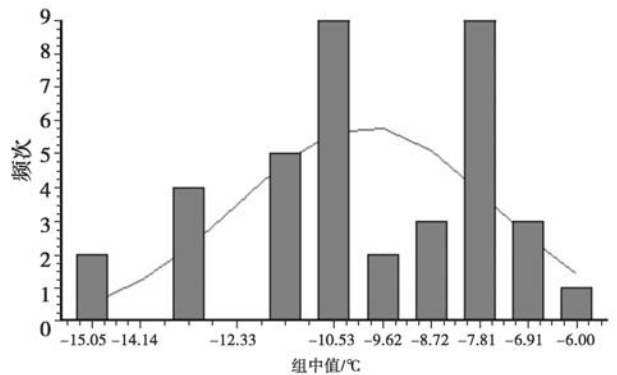


图4 白蜡虫雌成虫越冬后过冷却点的频次分布

表2 白蜡虫雌虫不同虫态过冷却点多重比较结果

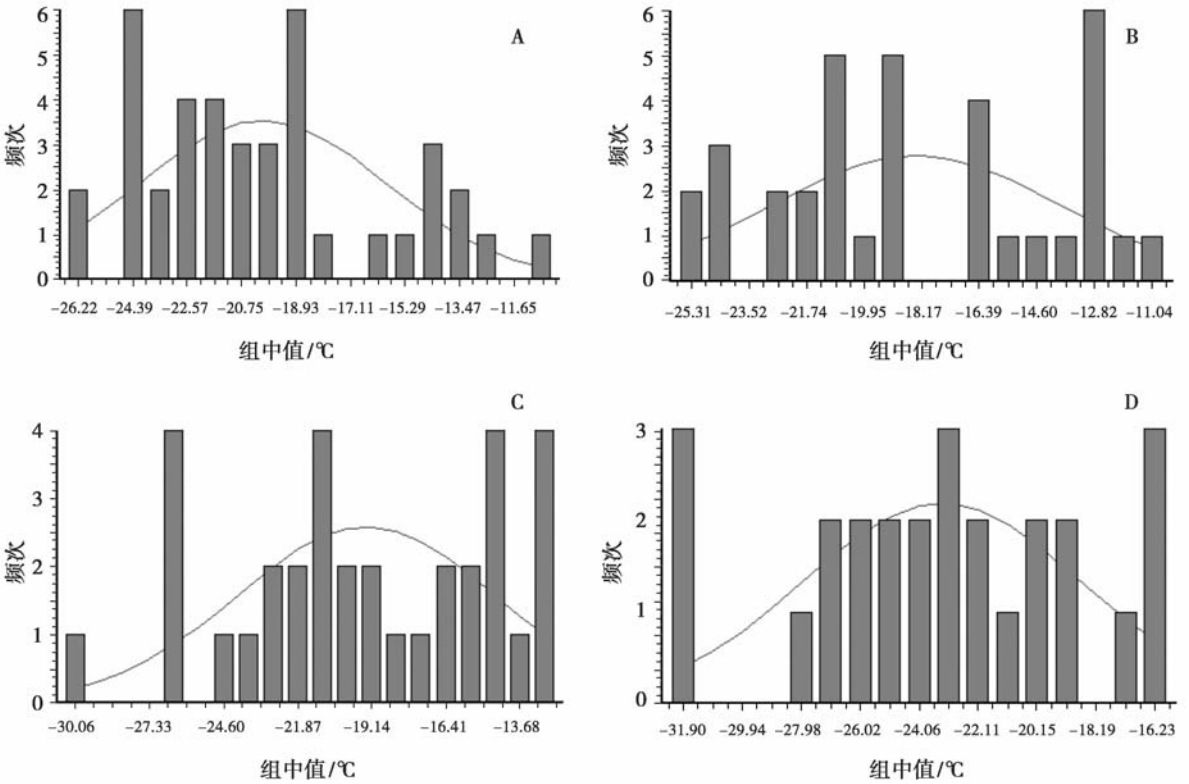
比较组	样本数1	样本数2	U 值	P 值
1龄—2龄	3	2	0.296 2	0.767 1
1龄—越冬成虫	3	40	2.550 6	0.010 8**
1龄—越冬后成虫	3	38	1.527 0	0.126 8
2龄—越冬成虫	2	40	1.860 5	0.062 8*
2龄—越冬后成虫	2	38	2.078 9	0.037 6**
越冬成虫—越冬后成虫	38	40	7.232 6	0.000 0***

注:与其它虫态差异均显著的虫态黑体显示, * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

2.2 不同地理种群白蜡虫越冬雌成虫过冷却点的变化

对昆明、峨眉和长春三地越冬白蜡虫雌成虫个体

SCP 测定表明:只有昆明种群 SCP 分布符合正态分布,SCP 分布范围和中值如上所述。峨眉种群 SCP 分布范围与昆明种群接近,但不符合正态分布($\chi^2 = 36.91$, $df = 15$, $P = 0.0013$),范围在 $-10.59 \sim -25.75$ °C 间,中值为 -19.14 °C (图6)。1月和3月采集的长春种群 SCP 分布均不符合正态分布(1月: $\chi^2 = 33.09$, $df = 18$, $P = 0.0163$; 3月: $\chi^2 = 29.81$, $df = 15$, $P = 0.0126$) (图5),与其它2个地理种群相比,1月长春种群 SCP 分布范围最宽,范围在 $-12.73 \sim -30.51$ °C 间,最低值和最高值相差近 18 °C,中值为 -19.49 °C (图6);3月长春种群 SCP 范围在 $-15.74 \sim -31.76$ °C 间,中值为 -23.19 °C (图6)。



A:昆明种群;B:峨眉种群;C:长春种群(1月);D:长春种群(3月)

图5 白蜡虫不同地理种群越冬雌成虫过冷却点的频次分布

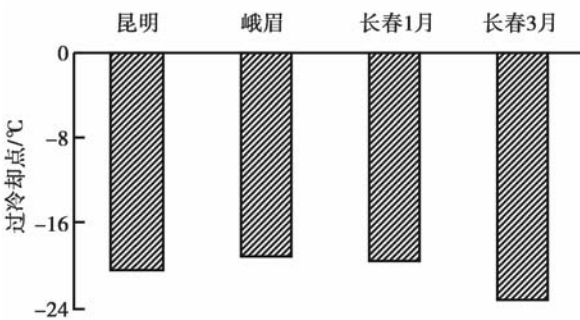


图6 不同地理种群白蜡虫越冬雌成虫过冷却点的变化

Wilcoxon 分析表明:长春(3月)的白蜡虫越冬雌成虫 SCP 显著高于昆明、峨眉和长春(1月)越冬雌成虫,但长春(1月)越冬雌成虫 SCP 和昆明、峨眉越冬雌成虫无显著差异(表3)。

3 讨论

本研究对昆明白蜡虫不同虫态的 SCP 测定发现,其越冬雌成虫 SCP 显著低于其它虫态,这可能是

表3 不同地理种群白蜡虫越冬雌成虫过冷却点
多重比较结果

比较组	样本数1	样本数2	U 值	P 值
昆明—峨眉	40	35	1.630 2	0.103 1
昆明—长春1月	40	34	0.808 1	0.419 0
昆明—长春3月	40	26	2.598 4	0.009 4***
峨眉—长春1月	35	34	0.846 2	0.397 4
峨眉—长春3月	35	26	3.573 1	0.00 4***
长春1月—长春3月	34	26	2.916 4	0.003 5***

注:与其它地理种群差异均显著的黑体显示, * $P < 0.1$, * * $P < 0.05$, * * * $P < 0.01$ 。

在周而复始的季节变化规律中,白蜡虫已经形成了相应的生存适应机制,在其它昆虫的研究中也有类似的发现,例如,飞蝗冬季种群卵的过冷却点显著低于夏季种群卵的过冷却点^[14],一种甲螨(*Phauloppia* sp.)的过冷却点在1月份为 -35.3°C ,而7月份的值则为 -9.4°C ^[15]。本研究的SCP测定也表明,处于同一发育阶段的白蜡虫个体间SCP有一个较大的分布范围,表明它们间的SCP存在很大个体差异。进一步分析这些现象的原因后,认为这种现象是变温动物的一种适应策略,在遭受突如其来的意外寒冷的情况下,这些个体也能存活下来^[16]。因此,就白蜡虫而言,由于其固定在寄主植物枝条上生活,足退化,不能像其他昆虫那样可以采用迁移等方式躲避低温环境,在这种情况下,白蜡虫为了适应环境,必须通过降低自身的过冷却点以避免细胞和组织结冰而导致死亡。例如,长春地区越冬虫某些个体的SCP在 -30°C 以下,这与长春冬季的极端低温接近,在遭遇极端低温的情况下,这些个体可以存活并繁衍种群,使后代种群表现出增强的抗寒能力。一些相关的研究也发现,桔小实蝇同一虫态个体的SCP也出现了不同程度的变异^[17],南美斑潜蝇(*Liriomyza huidobrensis* (Blanchard))的夏季种群中也有一些个体保持有较低的SCP^[3]。

对于昆明、峨眉和长春三地越冬白蜡虫SCP测定发现,地处南方温暖地区(昆明)的越冬白蜡虫SCP与严寒地区白蜡虫越冬初期(长春,1月)SCP无显著差异,昆明种群白蜡虫降低其SCP似乎没有进化上的意义和必要,这可能是由于在我国长期的白蜡生产中,各地调运种虫频繁^[18],导致不同种群间存在杂交的可能,基因交流频繁,从而导致温暖地区的越冬白蜡虫SCP也非常低。同时,本研究的结果也发现,长春地区越冬虫一直保持较低的SCP,尤其是3月份越冬虫的SCP显著高于其它地区的越冬

虫,这说明严寒地区白蜡虫不但抗寒能力有显著提高,且能较长时间保持这种抗寒能力,这也与当地冬季漫长以及极度低温的气候特点相适应,严寒地区白蜡虫可能存在低温驯化。康乐等^[3,9]对不同地理种群南美斑潜蝇研究发现,其越冬蛹的过冷却点随着纬度升高而降低,认为其耐寒能力的获得是在长期的地理适应中形成的,经历了较长时间的驯化和适应,包括不同地理种群之间的基因交流。由于SCP与虫体内化学物质组成有很大关系,SCP的差异表明了不同虫体内部抗寒物质积累的程度不同^[2]。因此,结合本研究的结果可以推测,白蜡虫在向严寒地区扩散过程中,也经历了一个不断选择和适应的过程。由于不同地理种群白蜡虫越冬虫普遍具有较强的过冷却能力,其种群扩散可能存在“跳跃”性,这也是该虫与其它昆虫如南美斑潜蝇等有所不同的地方。

由于白蜡虫雄成虫在夏季交配后即死亡,本研究未对雄成虫SCP进行测定。此外,抗冻相关蛋白对昆虫过冷却能力的调节有至关重要的作用^[19-23],因此,要阐明白蜡虫抗寒性的获得还需开展抗冻蛋白、热激蛋白表达变化等方面的相关研究。

参考文献:

- [1] 李 庆, 王思忠, 封传红, 等. 西藏飞蝗(*Locusta migratoria tibetensis* Chen)耐寒性理化指标[J]. 生态学报, 2008, 28(3): 1314-1320
- [2] 孙绪良, 王兴华, 李恕廷, 等. 昆虫的耐寒机制及其研究进展[J]. 山东农业大学学报, 2001, 32(3): 393-396
- [3] 陈 兵, 康 乐. 南美斑潜蝇地理种群蛹过冷却点随纬度递变及其对种群扩散的意义[J]. 动物学研究, 2003, 24(3): 168-172
- [4] 陈 兵, 康 乐. 昆虫对环境胁迫的适应与种群分化[J]. 自然科学通报, 2005, 15(3): 265-271
- [5] 孔 锋, 韩瑞东, 裴元慧, 等. 美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 越冬蛹的抗寒性研究[J]. 蚕业科学, 2007, 34(4): 534-537
- [6] 许益鏊, 陆永跃, 黄 俊, 等. 红火蚁自然种群耐寒性的研究[J]. 昆虫学报, 2009, 52(9): 974-983
- [7] Ansart A, Made L, Vernon P. Supercooling ability is surprisingly invariable in eggs of the land snail *Cantareus aspersus* [J]. Cryobiology, 2007, 54(1): 71-76
- [8] Sinclair B J, Klok C J, Scott M B, et al. Diurnal variation in supercooling points of three species of Collembola from Cape Hallett, Antarctica [J]. Journal of insect physiology, 2003, 49(11): 1049-1061
- [9] Kang L, Chen B, Wei J N, et al. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control [J]. Annual

- review of entomology, 2009, 54: 127 - 45
- [10] 陈晓鸣, 冯 颖. 资源昆虫学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 29 - 39
- [11] 王志明, 许晓明. 长春市一新外来入侵物种——白蜡虫的生物学而特性与种群控制研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28 (2): 152 - 154
- [12] 陈小平. 白蜡虫的研究进展[J]. 四川林业科技, 2007, 28 (1): 50 - 55
- [13] 唐启义. DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 28 - 30, 213 - 215
- [14] 景晓红, 康 乐. 飞蝗越冬卵过冷却点的季节性变化及生态学意义[J]. 昆虫知识, 2003, 40 (4): 326 - 328
- [15] Sjørnsen H, Sømme L. Seasonal changes in tolerance to cold and desiccation in *Phauloppia* sp. (Acari, Oribatida) from Finse, Norway[J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46 (10): 1387 - 1396
- [16] Klok C J, Chown S L. Interactions between desiccation resistance, host-plant contact and the thermal biology of a leaf-dwelling subantarctic caterpillar, *Embryonopsis halticella* (Lepidoptera: Yponomeutidae)[J]. Journal of Insect Physiology, 1998, 44: 615 - 628
- [17] 侯柏华, 张润杰. 桔小实蝇不同发育阶段过冷却点的测定[J]. 昆虫学报, 2007, 50 (6): 638 - 643
- [18] 龙村倪. 中国白蜡虫的养殖及白蜡的西传[J]. 中国农史, 2004 (4): 18 - 23
- [19] Huang L H, Wang C Z, Kang L. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*[J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 55 (3): 279 - 285
- [20] Moribe Y, Oka K, Niimi T, et al. Expression of heat shock protein 70a mRNA in *Bombyx mori* diapause eggs[J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56 (9): 1246 - 1252
- [21] Qiu L M, Ma J, Wang J, et al. Thermal stability properties of an antifreeze protein from the desert beetle *Microdera punctipennis*[J]. Cryobiology, 2010, 60 (2): 192 - 197
- [22] Sun J H, Chen J Y, Kuang J F, et al. Expression of sHSP genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55 (2): 91 - 96
- [23] Zhang Q, Denlinger D L. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm[J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56 (2): 138 - 150