

温度胁迫对棉蚜存活及其总蛋白含量的影响

史彩华,赵惠燕,吴月宁,提力克

(西北农林科技大学 植保学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了探明温度胁迫对不同体色型棉蚜存活状况的影响及其与体内总蛋白含量的关系,对室内饲养的两种体色型棉蚜进行变温(10,15,25和30℃)应激处理,研究温度胁迫对棉蚜存活及其总蛋白含量的影响。结果表明,黄色型和绿色型棉蚜仅在处理时间为1d时可见死亡现象,在10℃1d和30℃1d时存活率最低,分别为83.33%和51.11%。将活蚜放入各自的对照温度下恢复15h后,同一胁迫温度下,随着应激时间的延长,棉蚜的存活率开始呈下降趋势,以后慢慢上升,两种体色型棉蚜分别在15℃1d和10℃1d时存活率最高,达到98.72%和97.48%;且高温有利于黄色型棉蚜生存,低温有利于绿色型棉蚜生存。同一胁迫温度下,随着处理时间的延长,棉蚜体内总蛋白含量呈上升趋势,黄色型和绿色型棉蚜分别在10℃30min和30℃30min时最大,达到109.99和108.46μg/mg,超过此时间,棉蚜体内总蛋白含量开始下降,但始终高于各自的对照。棉蚜总蛋白含量随不同时间和温度的变化呈偏峰态趋势,其最佳总蛋白含量的时间和温度区域分别为30~60min和28~32℃及7~12℃。

[关键词] 棉蚜;温度胁迫;存活率;总蛋白含量

[中图分类号] S435.622⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0167-04

Effects of temperature on the survival and total proteins content in *Aphis gossypii* Glover (F.) (Homoptera:Aphididae)

SHI Cai-hua,ZHAO Hui-yan,WU Yue-ling,TI Li-ke

(College of Plant Protection,Northwest A & F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: In the lab,the survival rate and the total protein content of *Aphis gossypii* Glover were examined by means of variable temperature. The results were as follows:the death occurred in yellow type and green type only for 1 d treatments,and the survival rates at 10 and 30℃ were the lowest,which were 83.33% and 51.11%,respectively. Results suggested that with the stress time prolonged,the survival rates decreased at first,then increased slowly under the same temperature. Furthermore,the higher temperature benefited the yellow Aphids survival and the lower one increased the green Aphids survival. Finally,with the time increasing under the same temperature,the total protein content,showed an increasing tendency,and the values reached the tops at 10 and 30℃ for 30 min,which were 109.99 and 108.46 μg/mg. Beyond 30 min the content began to drop down but always above the control. At the meanwhile,there was no significant difference between the two colors Aphids. The total protein content of cotton aphids show the trend of partial kurtosis with the change of different time and temperature,which shows the optimal field of time and temperature on total protein content is 30 - 60 min and 28 - 32℃ and 7 - 12℃,respectively.

Key words: *Aphis gossypii* Glover;temperature stress;survival rate;total proteins

收稿日期] 2006-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970112,30470268);陕西省重点项目(2001SM01)

[作者简介] 史彩华(1980-),男,湖北天门人,在读硕士,主要从事昆虫生态遗传学研究。E-mail:shicaihua1980@126.com

[通讯作者] 赵惠燕(1956-),女,河南西平人,教授,博士生导师,主要从事昆虫生态遗传学研究。E-mail:zhaohy@yahoo.com.cn

棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover) 属同翅目 Homoptera, 蚜科 Aphididae, 广泛分布于北纬 60° 至南纬 40° 地区^[1], 是棉花、花椒、石榴和瓜类等作物的重要农业害虫。棉蚜有黄色型、绿色型和中间型不同体色。汪世泽等^[2]依据棉蚜体色随温度变化提出了“季节生物型”的概念, 指出决定棉蚜体色的主要因素是温度。赵惠燕等^[3]研究发现, 黄、绿色棉蚜互变的临界温度为 20.65, 温度越高棉蚜体色变黄越快, 温度越低变绿越快。为探明棉蚜体色变化机理, 前人从寄主转化、染色体细胞学、同工酶、DNA 多态性等方面进行了大研究, 发现两种色型存在显著的 DNA 变异^[4-10], 但这种变异在蛋白质水平上的表现, 及其与热休克蛋白的关系还未见研究报道。程茂高等^[11]、张利军等^[12]根据国内外研究结果提出, 棉蚜体色变化有基因控制论、寄主专化论和环境因素控制论 3 种学说。

本文在前人研究的基础上, 用不同温度对黄色型和绿色型两种色型的棉蚜进行热胁迫处理, 研究温度胁迫对棉蚜存活及总蛋白变化的影响, 以期探索两种色型棉蚜对逆境反应的蛋白质分子差异。

1 材料与方法

1.1 材料

棉蚜采自陕西杨凌附近的花椒树, 在实验室人工气候箱内用棉叶饲养多代, 黄色型和绿色型棉蚜的饲养温度分别为 22 和 18, 光周期为 L/D = 14 h/10 h, 相对湿度均为 (60 ± 10) %。

1.2 方法

1.2.1 温度胁迫对棉蚜存活率的影响 分别在黄色型和绿色型棉蚜中挑选 4 龄棉蚜放入培养皿中饲养, 每皿 30 头, 用不同温度 (10, 15, 25 和 30) 分别处理不同时间 (5, 10, 20, 30 和 60 min 及 1 d), 以

22 和 18 饲养的黄色型和绿色型棉蚜为对照, 处理后立即观察, 并记录其存活状况; 将处理后的活蚜分别放入其对照温度下恢复 15 h, 再观察并记录存活状况, 每处理 3 次重复, 取平均值。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{处理后的活蚜数}}{\text{处理前的活蚜数}} \times 100 \%。$$

1.2.2 温度诱导棉蚜的热休克反应 分别在两种棉蚜中挑选足够多的 4 龄棉蚜, 放入培养皿中饲养。设: (1) 对照组。黄色型和绿色型棉蚜分别在 22 和 18 条件下饲养, 不作热休克处理。(2) 热休克处理组。设置 10, 15, 25, 30 4 个应激温度和 5, 10, 20, 30, 60 min 及 1 d 6 个不同时间段。经上述处理后, 再分别放入其对照温度中恢复 15 h, 分装, 放入 -80 冰箱保存待用。

1.2.3 测定方法 总蛋白的浸提: 称取 5 mg 棉蚜, 参考文献[13]的方法浸提。总蛋白含量测定: 参考文献[14]的方法。

1.3 数据处理

方差分析、方程拟合和作图采用 DPS 软件、SPSS 软件和 Matlab 6.5 软件。

2 结果与分析

2.1 不同时间不同温度胁迫下棉蚜的存活状况

不同时间不同温度胁迫下, 与对照相比, 两种色型棉蚜只有在应激时间为 1 d 时存活率变化显著, 而其他时间和温度处理的棉蚜全部成活, 其中黄色型和绿色型棉蚜分别在 10 1 d 和 30 1 d 时存活率最低, 为 83.33 % 和 51.11 % (表 1)。说明变化温度处理稍长时间 (1 d) 可造成棉蚜死亡, 而其他处理的胁迫可使棉蚜体内发生一系列相应的生理生化反应, 不能导致棉蚜立即死亡。

表 1 棉蚜胁迫处理 1 d 后的存活率

Table 1 Livability of *Aphis gossypii* through stressing for 1 d

棉蚜色型 Cotton Aphids color type	温度/ Temperature	存活率/ % Survival rate	棉蚜色型 Cotton Aphids color type	温度/ Temperature	存活率/ % Survival rate
黄色型 Yellow type	22(CK)	95.56 aA	黄色型 Yellow type	30	85.56 cdBCD
绿色型 Green type	18(CK)	95.56 aA	黄色型 Yellow type	15	85.56 cdBCD
绿色型 Green type	15	93.33 abAB	绿色型 Green type	25	84.44 dCD
黄色型 Yellow type	25	92.22 abcABC	黄色型 Yellow type	10	83.33 dD
绿色型 Green type	10	86.67 bcdBCD	绿色型 Green type	30	51.11 eE

注: 不同小写字母表示差异显著, 不同大写字母表示差异极显著。下表同。

Note: Different small letters show notable difference, and different capital letters show more notable difference, the same as following table.

将应激处理后存活的棉蚜放入各自的对照温度下恢复 15 h 后,观察结果表明:同一胁迫温度下,随着应激时间的延长,棉蚜的存活率最初呈下降趋势,后慢慢上升。黄色型和绿色型棉蚜分别在 15 1 d 和 10 1 d 时存活率最高,达到 98.72 %和97.48 % (表 2)。这进一步说明短时间内的胁迫不能导致棉

蚜立即死亡,可使其体内发生一系列相应的生理生化反应,如果生理上克服不了这种逆境反应,将会导致其死亡;如果适应了这种逆境反应,将会延续其生命,并且产生耐受性,更适合于生存。同时,从表 2 可以看出,高温有利于黄色型棉蚜生存,低温有利于绿色型棉蚜生存。这与董应才等^[15]的结论相一致。

表 2 棉蚜胁迫处理后在其对照温度下恢复 15 h 后的存活率

Table 2 Livability of *Aphis gossypii* after living in the temperature of comparison for 15 h

棉蚜色型 Cotton Aphids color type	处理 Treatment		存活率/ % Survival rate	棉蚜色型 Cotton Aphids color type	处理 Treatment		存活率/ % Survival rate
	温度/ Temperature	时间 Time			温度/ Temperature	时间 Time	
黄色型 Yellow type	15	1 d	98.72 aA	绿色型 Green type	18 (CK)		87.07 cdeBCD
黄色型 Yellow type	10	1 d	98.61 aA	绿色型 Green type	30	30 min	86.55 cdeBCD
绿色型 Green type	10	1 d	97.48 abAB	黄色型 Yellow type	15	1 h	85.56 deCD
黄色型 Yellow type	22 (CK)		88.34 acdeBCD	黄色型 Yellow type	10	1 h	85.56 deCD
黄色型 Yellow type	30	1 h	87.78 bcdeABCD	绿色型 Green type	30	1 h	81.11 eD
绿色型 Green type	30	10 min	87.78 bcdeBCD				

注:表中只列出了部分与黄色型 15 1 d 和绿色型 10 1 d 相比差异较显著的处理,其他处理略。

Note:it is only a part of different comparison with yellow at 15 for 1 d and green at 10 for 1 d in table 2,others were elided.

2.2 胁迫条件与棉蚜总蛋白含量的关系

2.2.1 对棉蚜总蛋白含量的影响 不同时间不同温度胁迫下,两种色型棉蚜体内总蛋白含量与其对照差异显著。同一胁迫温度下,随着处理时间的延长,棉蚜体内总蛋白含量呈上升趋势,黄色型和绿色型棉蚜分别在 10 30 min 和 30 30 min 时最大,达到 109.99 和 108.46 μg/ mg,说明棉蚜受胁迫后体内产生大量特定蛋白质来克服这种胁迫逆境;随着胁迫时间的延长,棉蚜体内总蛋白含量开始下降,但始终高于其各自对照,说明随着胁迫时间的延长,棉蚜逐渐适应了这种逆境,体内开始恢复正常的生理反应,但是未能完全回到正常生理状态;在对照温度下,两种色型棉蚜体内总蛋白含量差异不显著;在同一处理时间,两种色型棉蚜的胁迫温度与对照温度差值相近时,其体内总蛋白含量差异也不显著,表明与对照温差越大,棉蚜体内总蛋白含量变异越大。

方差分析结果表明,温度和时间对两种色型棉蚜体内总蛋白含量增长均有显著影响,即温度和时间不同将对棉蚜体内总蛋白含量的增长率产生显著影响,并且温度和时间的影响会产生交互作用,这种交互作用对总蛋白增长率的影响也是显著的。

2.2.2 棉蚜体内总蛋白含量的变化规律 棉蚜体

内总蛋白含量随不同时间和温度的变化呈偏峰态趋势,表现出最佳总蛋白含量的时间和温度区域。将温度、时间和总蛋白含量取对数(因本文所取的时间间隔较大,不均一,不便于进行方程拟合,所以取对数来减少误差),用下列函数描述其变化规律:

$$F(X, Y) = A(X + a)^b + B(Y + c)^b + C.$$

式中: $F(X, Y)$ 为棉蚜体内总蛋白含量的对数值, X 为温度的对数值, Y 为时间的对数值, a, c 为位置参数, b 为形状参数, C 为常数, A, B 为面积参数。得出函数:

$$Z_{黄} = F_{黄}(X, Y) = 9.709068 - 3.991309X + 0.681936X^2 + 0.236397Y - 0.02794Y^2,$$

$$Z_{绿} = F_{绿}(X, Y) = 13.255583 - 6.739372X + 1.199531X^2 + 0.209945Y - 0.024178Y^2.$$

棉蚜体内总蛋白含量、时间和温度三者对数值的三维曲面见图 1 和图 2。

根据方程可得出最佳总蛋白含量的时间和温度区域分别为 30 ~ 60 min 和 28 ~ 32 及 7 ~ 12 , 进一步证实了不同温度和时间对棉蚜体内总蛋白含量的增长率产生显著影响,并且温度和时间的影响会产生交互作用。

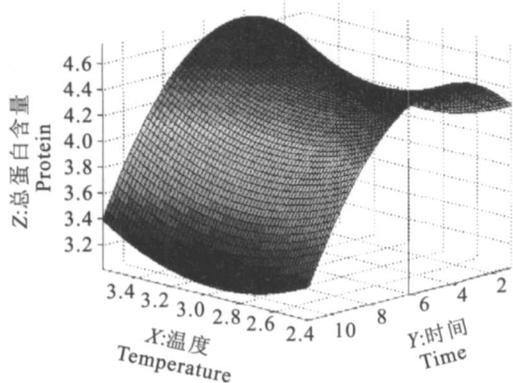


图 1 黄色型棉蚜体内总蛋白含量与温度及时间的关系

Fig. 1 Relation of total protein content to temperature and time in yellow cotton Aphids

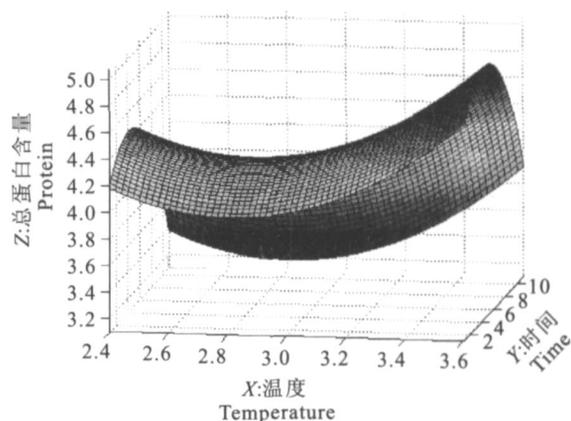


图 2 绿色型棉蚜体内总蛋白含量与温度及时间的关系

Fig. 2 Relation of total protein content to temperature and time in green cotton Aphids

3 结论与讨论

本研究结果表明,两种色型棉蚜的存活率与胁迫温度及时间有显著关系。棉蚜在改变生境后,产生了不适应,同时在棉蚜体内也发生了相应的生理生化反应,以克服这种死亡现象的持续,并且在以后的胁迫过程中产生了耐热性。

胁迫处理的棉蚜体内总蛋白含量与其对照差异显著。棉蚜体内总蛋白含量在其胁迫后的变化趋势因不同的热激条件而不同,说明生物体既能感知热激的程度,又能感知热激的持续时间,从而对不同的热激条件产生不同的反应机制。因此,本文的研究为热胁迫使棉蚜产生耐受性提供了理论基础,为棉蚜进行热胁迫所需温度和时间提供了参考依据。

但是,生物获得的耐热性与热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)的产生密切相关^[16-17],并且与耐热性相关的 HSPs 随着生物不同而不同,如在酵母细胞中,主要负责耐热性的是 Hsp104,在哺乳动物细胞内是 Hsp90,在果蝇细胞内是 Hsp70^[18]。本研究结果表明,棉蚜随温度胁迫产生了明显的耐热性,但这一耐热性的产生与哪类 HSPs 相关有待进一步研究。同时,本文得出的方程仅能反应恢复时间为 15 h 时棉蚜体内总蛋白含量的变化趋势,而不同梯度恢复时间处理的表现如何,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 龚 鹏,张孝羲,杨效文,等.用微卫星引物 PCR 分析棉蚜不同蚜型的 DNA 多态性[J].昆虫学报,2001,44(4):416-421.
- [2] 汪世泽,赵惠燕,张改生.棉蚜体色分化与季节生物型问题[J].

- 西北农学院学报,1983,11(2):19-23.
- [3] 赵惠燕,汪世泽,张改生.棉蚜体色变化的生态遗传学研究[J].昆虫学报,1993,17(3):79-83.
- [4] 原国辉,彭 红,潘 森,等.棉蚜在不同寄主上的体色分化研究[J].河南农业大学学报,2001,36(1):7-10.
- [5] 赵惠燕.蚜虫体色变化的生态遗传学研究[D].陕西杨凌:西北农业大学,1996:33-39.
- [6] 龚 鹏.棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 种群分化的分子遗传标记研究及性蚜的诱导[D].江苏南京:南京农业大学,2000:18-34.
- [7] 龚 鹏,杨效文,张孝羲,等.棉蚜种群寄主分化和季节分化的微卫星 PCR 研究[J].生态学报,2001,21(5):765-771.
- [8] 姚建秀,赵惠燕.紫外条件诱导下麦长管蚜 DNA 的变异研究[J].西北农业学报,2001,10(1):33-36.
- [9] 蔡凤环,赵惠燕.麦长管蚜自然群体的遗传变异研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(2):21-24.
- [10] Gong P,Zhang X X,Yang X W,et al. PAPD-PCR detection of DNA polymorphism of cotton Aphid[J]. Entomologia Sinica, 2000,7(1):41-46.
- [11] 程茂高,乔卿梅,原国辉.昆虫体色分化研究进展[J].昆虫知识,2005,42(2):502-505.
- [12] 张利军,李友莲,范晓峰.蚜虫种下体色变化机理研究[J].山西农业科学,2003,31(2):59-63.
- [13] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning:a laboratory manual[M].Beijing:Science Press,2002.
- [14] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2003:95-97.
- [15] 董应才,汪世泽.不同体色棉蚜的适温测定[J].中国棉花,1994,21(3):12-13.
- [16] Charles A,Janeway J R,Paul T,et al. Immunobiology[M]. 4th ed. New York:Current Biology Publications,1999.
- [17] Srin S N. Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen,heat shock chaperone gp96 (GRP94)[J]. Biological Chemistry,1999,274(17):12023-12032.
- [18] 王海鸿,雷仲仁.昆虫热休克蛋白的研究进展[J].中国农业科学,2005,38(10):2023-2024.