

麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中 蜕皮激素的定量分析

成卫宁¹ 李建军¹ 李怡萍¹ 李修炼¹ 仵均祥^{1*} 王洪亮²

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室,
陕西 杨凌 712100; 2. 河南科技学院植物保护系, 新乡 453003)

摘要: 为明确麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中体内蜕皮激素的变化规律, 采用放射免疫分析法测定了麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中的蜕皮激素滴度。结果表明, 同一天羽化的成虫, 雌虫蜕皮激素滴度为 7.43 pg/头, 显著高于雄虫; 滞育前后及滞育期幼虫蜕皮激素滴度存在显著差异, 滞育前为 5.22 pg/头, 进入滞育后显著降低; 滞育期间, 冬季蜕皮激素滴度为 6.64 ~ 7.10 pg/头, 显著高于其它季节; 滞育解除后蜕皮激素滴度显著降低, 之后随着幼虫的生长发育逐渐升高, 至化蛹前约 1 周达到最高, 为 15.22 pg/头。滞育期间同期裸露幼虫与结茧幼虫, 以及不同滞育年限幼虫的蜕皮激素滴度差异均不显著。

关键词: 麦红吸浆虫; 蜕皮激素; 放射免疫法

Quantitative analysis of ecdysteroid in adults and the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* Gehin

Cheng Weining¹ Li Jianjun¹ Li Yiping¹ Li Xiulian¹ Wu Junxiang^{1*} Wang Hongliang²

(1. Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, the College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;
2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxing 453003, Henan Province, China)

Abstract: In order to understand the roles of ecdysteroid in adults and diapausing larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* Gehin, radioimmunoassay was firstly used to analyze the ecdysteroid titers in adults, pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge. For adults emerged from pupae in the same day, the ecdysteroid titer in female (7.43 pg/individual) was significantly higher than that in male (0.15 pg/individual). The ecdysteroid titer in/among pre-diapause, diapause and post-diapause larvae showed significantly different. The ecdysteroid titer was 5.22 pg/individual in pre-diapause larvae and then decreased significantly after entering diapause. It was 6.64 ~ 7.10 pg/individual in over-wintering diapause larvae, significantly higher than those in other stages during diapause. It reduced significantly after diapause termination, and increased gradually with the development and reached a peak, making up 15.22 pg/individual about one week before pupation. No obvious difference of ecdysteroid titers was found between 1st and 2nd year of diapause larvae, as well as between no-cooed and cocooned larvae in the same diapause stages.

Key words: *Sitodiplosis mosellana*; ecdysteroid; radioimmunoassay

基金项目: 教育部重点项目 (105165), 国家自然科学基金项目 (30370936), 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD08A05)

作者简介: 成卫宁, 女, 1967 年生, 副教授, 研究方向为害虫综合治理, email: cwning@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: junxw@nwsuaf.edu.cn; 收稿日期: 2008-11-14

麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) 是重要的农业害虫,20 世纪 50 年代和 80 年代两次在我国大面积暴发成灾。近年来,虽然得到了有效遏制,但局部地区仍时有发生^[1]。多年来的研究表明,麦红吸浆虫特有的越夏滞育、越夏至越冬滞育、二次滞育和延长多年滞育的滞育多态现象是引起其间歇性和局域性猖獗成灾的主要原因^[2-3]。

有关麦红吸浆虫的滞育调控机制研究,以往主要集中于环境生态学^[4-5]和生理生化方面^[6-9],而对内分泌学方面的研究很少^[10],致使对其滞育的内分泌机制认识严重不足。蜕皮激素(molting hormone, MH)是由昆虫前胸腺分泌的一类多羟基甾醇类化合物,在昆虫变态发育中起着重要的作用。大量研究表明, MH 含量的变化是调节昆虫滞育的重要因子^[11-14],而对于麦红吸浆虫这种具有滞育多态性的昆虫, MH 在其滞育中所起的作用,迄今尚未见报道。

放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)是放射性同位素示踪技术与免疫反应原理相结合的一种体外超微量分析法,其特点是灵敏度高、特异性强、取样量少、操作简便且不会引起生物体的辐射损伤。为明确麦红吸浆虫成虫和幼虫滞育过程中 MH 滴度的变化规律,作者采用该方法对其成虫和滞育前后及滞育期幼虫 MH 滴度进行了分析。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2004 年 4 月下旬麦红吸浆虫成虫发生期,从河北省徐水县麦田用网捕法获得其成虫,立即放入冰壶带回,置 -80℃ 保存备用。同年 5 月小麦黄熟期,大量采集被麦红吸浆虫危害的麦穗,带回养虫圃内(此时采集部分麦穗老熟幼虫,作滞育前幼虫样本),让老熟幼虫自然落土进入滞育,于入土后 1 个月、当年夏季、秋季、初冬、严冬、翌年滞育解除前(2005-01-28)、开始解除滞育及滞育解除后不同发育阶段(2005-03-10、2005-03-20、2005-04-01)、二次滞育初期(2005-04-28、2005-05-25)及翌年夏季、秋季和冬季分别进行采集,获得不同时期的麦红吸浆虫幼虫,置 -80℃ 保存备用。

1.2 主要试剂

60% 甲醇、含 0.1% 明胶的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(简称 GPBS, pH 7.0)、20-羟基蜕皮酮标准工作液 5 ng/mL、20-羟基蜕皮酮抗血清工作液(1:

10 000 Ab)、¹²⁵I 标记的 20-羟基蜕皮酮工作液、1% 葡聚糖活性炭悬浮液(简称 DDC),以上试剂均由中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所蒋蓉静老师提供。

1.3 MH 的抽提

取同一时间采集的麦红吸浆虫 100 头,蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干水分,称重后移入玻璃匀浆器中,按重量与体积比加入 60% 甲醇研磨提取,匀浆液于 8 000 r/min 下离心 15 min,吸取上清。沉淀再用等量 60% 甲醇抽提一次,合并两次上清液,70~80℃ 水浴下蒸干。然后加入等量双蒸水和氯仿,充分摇匀后静置分层,吸取水相,再次置 80℃ 水浴下蒸干,最后加入一定量的无水乙醇,充分振荡后放入 -20℃ 保存备用,每处理重复 3 次。

1.4 MH 滴度的 RIA 测定

参考曹梅讯^[15]所建立的方法,略加修改。取 12 mm × 75 mm 玻璃试管若干,每管先加 200 μL GPBS,再依次加入 0、25、50、100、200、400、800 和 1 600 pg 的 20-羟基蜕皮酮标准工作液和样品(加入量根据预备试验确定),最后再分别加 1:10 000 稀释度的抗血清和标记抗原各 100 μL。另取一试管加入 400 μL GPBS,但不加抗血清和标记抗原,用作本底。再取一试管加入 300 μL GPBS 和 100 μL 标记抗原,但不加抗血清,用作非特异性结合率测定。混匀后,在 γ -计数器上测定各管的放射性总强度,然后置 4℃ 过夜。次日,各管依次加入 400 μL 1% DDC,立即混匀,静置 10 min 后用日立低温离心机在 4℃、3 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清,测定沉淀物的放射性强度。

1.5 数据统计分析

根据两次测定的放射性强度计算抗体与抗原的结合率,并绘制竞争性抑制标准曲线。根据样品与抗体的结合率查阅标准曲线,计算麦红吸浆虫的 MH 滴度。所得数据应用 DPS 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 幼虫滞育前后及滞育期 MH 滴度变化

麦红吸浆虫幼虫滞育前后及滞育期 MH 滴度存在显著差异。滞育前为 5.22 pg/头,进入滞育后显著降低。滞育期间,11 月 5 日以前 MH 滴度维持在较低水平,为 2.70~3.40 pg/头,随后至翌年 5 月变化较大,出现 2 个明显的高峰期,一是在冬季 12 月

底至 1 月 28 日, MH 滴度为 6.64 ~ 7.10 pg/头, 二是在解滞幼虫化蛹前约 1 周, 即 4 月 1 日, 为 15.22

pg/头。4 ~ 5 月部分发育尚未完全再次进入滞育的个体, 其蜕皮激素滴度再次下降(图 1)。

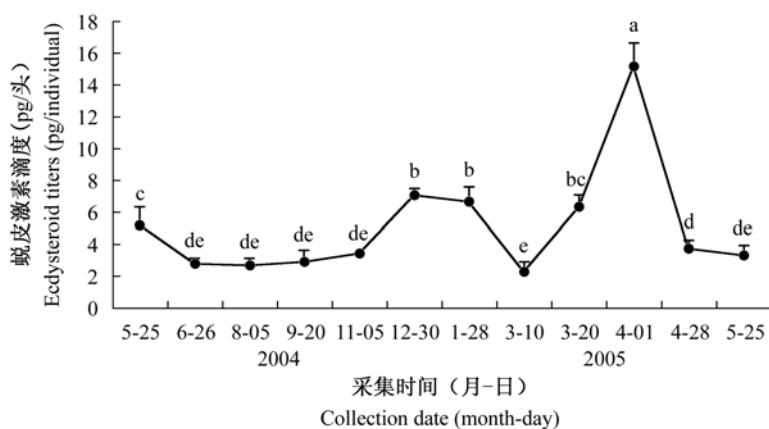


图 1 麦红吸浆虫幼虫滞育前后及滞育期 MH 滴度的变化

Fig. 1 Ecdysteroid titers in pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of *Sitodiplosis mosellana*

注:图中数据为平均值 ± 标准误,不同小写字母表示经 Duncan 氏多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 ~ 3 同。Note: The data in the figure are mean ± SE, different lowercase letters show significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same for the Figures 2 - 3.

2.2 不同滞育状态幼虫 MH 滴度比较

麦红吸浆虫在滞育过程中,以结茧幼虫和裸露幼虫两种形式存在,一般情况下,以结茧幼虫所占比例大。对 2004 年 8 月 5 日、9 月 20 日和 12 月 30 日同一时间采集的两种滞育状态幼虫 MH 滴度分析表明,整个滞育期,裸露幼虫和结茧幼虫 MH 滴度随季

节变化趋势相同,同一滞育阶段,二者 MH 滴度差异不显著。8 月 5 日、9 月 20 日和 12 月 30 日结茧幼虫和裸露幼虫 MH 滴度分别为 2.70 和 2.45 pg/头、2.95 和 3.13 pg/头以及 7.10 和 7.29 pg/头(图 2)。说明在同一时期,麦红吸浆虫幼虫前胸腺对 MH 的分泌能力与其所处的状态关系不大。

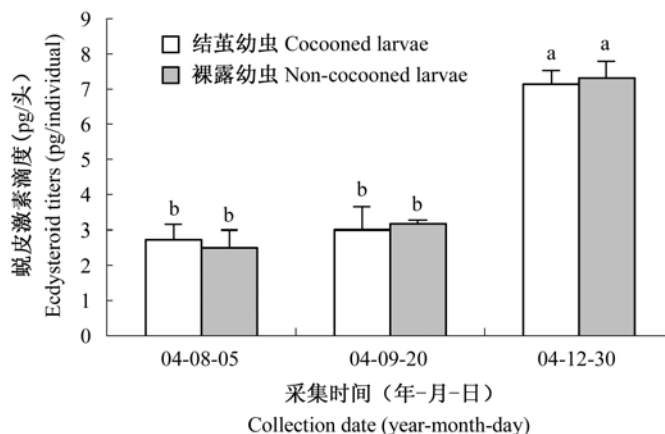


图 2 裸露幼虫和结茧幼虫 MH 滴度比较

Fig. 2 Comparison of ecdysteroid titers between cocooned and non-cocooned larvae of *Sitodiplosis mosellana*

2.3 不同滞育年限幼虫 MH 滴度比较

对 2004 年入土,2004 年和 2005 年 8 月上旬、9 月下旬和 12 月下旬同一时期采集的结茧幼虫的 MH 滴度分析表明,两年滞育与当年滞育幼虫 MH 滴度无明显差异。8 月上旬、9 月下旬和 12 月下旬当年滞育和两年滞育幼虫 MH 滴度分别为 2.70 和

3.07 pg/头、2.95 和 2.83 pg/头以及 7.10 和 7.05 pg/头(图 3)。说明同一时期麦红吸浆虫滞育幼虫前胸腺对 MH 的分泌能力与滞育年限无关。

2.4 成虫 MH 滴度测定

分别测定了 2004 - 04 - 29 同一天羽化的雌雄成虫蜕皮激素滴度。结果表明,雄虫蜕皮激素滴度

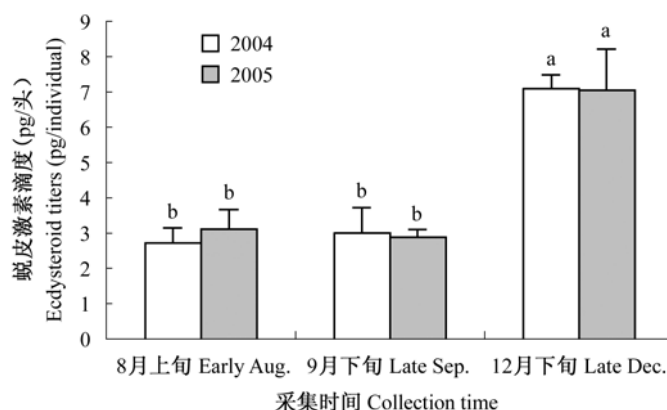


图3 不同滞育年限 MH 滴度比较

Fig. 3 Comparison of ecdysteroid titers in *Sitodiplosis mosellana* larvae with different diapause years

仅为 0.15 pg/头,而雌虫高达 7.43 pg/头,二者之间差异达极显著水平。

3 讨论

大量研究结果表明,昆虫滞育是由外界环境条件诱导,内分泌系统调控的一种发育现象,其中 MH 的作用十分重要。本研究结果显示,麦红吸浆虫进入滞育后,MH 滴度迅速降低,11 月前一直维持在较低水平,但冬季寒冷季节,MH 不仅迅速上升到滞育期间的最高水平,且高于滞育前。这表明冬季光周期和低温等环境因子对麦红吸浆虫脑神经分泌细胞的刺激作用较强,能促使其分泌较多的促前胸腺激素,最终使前胸腺分泌蜕皮激素的量增多,但此时高的 MH 滴度并不能促使麦红吸浆虫解除滞育,这是由于 MH 本身并不能决定昆虫的发育方向,而需与保幼激素(juvenile hormone, JH)联合作用。李英梅等^[10]研究表明,冬季麦红吸浆虫 JH 滴度较高,使其仍保持滞育状态,MH 此时的效应可能是引起皮层溶离、参与诱发幼虫的发育,即滞育的解除。该结论与 Basedow^[4]和 Hinks & Doane^[5]的报道相一致,即低温是解除麦红吸浆虫滞育不可缺少的条件。

本研究中,3 月上旬滞育解除后,MH 滴度显著下降,且低于整个滞育期,这与王方海等^[16]报道的滞育棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蛹的 MH 明显低于非滞育蛹的结果不同,但与 Suzuki 等^[17]和 Lee & Denlinger^[12]报道的舞毒蛾 *Lymantria dispar* 隐 1 龄幼虫滞育终止后 MH 下降的结论相一致。说明 MH 作为昆虫重要的发育调控因子,对不同滞育昆虫的调控机制不尽相同。此外,滞育解除后,随着幼虫的发育,MH 滴度逐渐升高,化蛹前约 1 周(4 月 1 日)达到最高。这与蔗扁蛾 *Opogona sacchari*^[18]和鞭角

华扁叶蜂 *Chinolyda flagellicornis*^[13]末龄幼虫化蛹前出现一个 MH 峰值的结论一致。

两年滞育幼虫与当年滞育幼虫相比,MH 滴度在不同季节的变化趋势基本相同,且同一时期无明显差异。这可能是由于前胸腺对 MH 的分泌受光周期和温度等环境因子的影响,而在同一地理位置,不同年份间这些环境因子随季节变化比较稳定,且同一时期变化幅度较小。

对于多数昆虫,通常成虫前胸腺已解体,即使未解体,也只能合成并分泌微量的 MH,而成虫体内的 MH 主要是由卵巢合成^[19-20]。本研究发现,麦红吸浆虫雄成虫 MH 滴度很低,而雌成虫含量则较高。说明在麦红吸浆虫成虫体内,MH 也是由卵巢合成。

本研究结果表明,MH 在麦红吸浆虫滞育过程中起一定的作用,但是否起决定性作用,还需要通过外部注射蜕皮激素类似物、虫体结扎及器官移植等手段进一步研究证实。另外,本研究仅测试分析了昆虫中普遍存在的 20-羟基蜕皮酮的滴度变化,麦红吸浆虫体内的其它蜕皮激素组分如蜕皮酮、26-羟基蜕皮酮等,以及这些组分在麦红吸浆虫滞育中的作用,均有待深入研究。

致谢:中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所曹梅讯和蒋蓉静老师为本研究提供帮助,特此致谢。

参 考 文 献(References)

- [1] 祝传书,袁锋. 河北南和县 2001 年麦红吸浆虫发生成灾. 植物保护, 2002, 28(2): 60-61
- [2] 袁锋,花保祯,仵均祥,等. 小麦吸浆虫成灾规律与控制. 北京:科学出版社, 2004
- [3] 仵均祥,李长青,李怡萍,等. 小麦吸浆虫滞育研究进展. 昆虫知识, 2004, 41(6): 499-503

- [4] Basedow T. The effect of temperature and precipitation on diapause and phenology in the wheat blossom midges *Contarinia tritici* (Kirby) and *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera; Cecidomyiidae). *Zoologische Jahrbucher Abteilung fur Systematik Okologie und Geographie der Tiere*, 1977, 104(3): 302 – 326
- [5] Hinks C F, Doane J F. Observations on rearing and diapause termination of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera; Cecidomyiidae) in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 1988, 81(6): 1816 – 1818
- [6] 仵均祥, 袁锋, 苏丽. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. *昆虫学报*, 2004, 47(2): 178 – 183
- [7] 仵均祥, 袁锋, 李怡萍. 麦红吸浆虫幼虫滞育状态及其核酸含量变化研究. *西北农林科技大学学报*, 2003, 31(6): 49 – 56
- [8] Wu J X, Yuan F. Changes of glycerol content in diapause larvae of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) in various seasons. *Entomologia Sinica*, 2004, 11(1): 27 – 35
- [9] Wu J X, Yuan F, Zhang Y M. Changes of fatty acids in larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera; Cecidomyiidae). *Entomologia Sinica*, 2001, 8(4): 315 – 322
- [10] 李英梅, 仵均祥, 成卫宁, 等. 麦红吸浆虫保幼激素含量测定. *西北农业学报*, 2006, 15(4): 73 – 75
- [11] Takeda M, Matsumoto M, Tohno Y. Diapause intensity and ecdysiotroph: Comparisons between two *Antheraea* species (Lepidoptera; Saturniidae) having summer and winter diapause at pupae. *European Journal of Entomology*, 1997, 94(1): 67 – 73
- [12] Lee K Y, Denlinger D L. A role for ecdysteroids in the induction and maintenance of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43(3): 289 – 296
- [13] 王满困, 李周直. 鞭角华扁叶蜂蛻皮甾类激素滴度的变化. *昆虫学报*, 2002, 45(5): 593 – 596
- [14] 苏天运, 王仲文, 王梅英, 等. 淡色库蚊越冬过程中体内保幼激素和蛻皮激素的变化. *河南医学研究*, 1994, 3(2): 110 – 113
- [15] 曹梅讯. 20-羟基蛻皮酮的放射免疫分析法. *昆虫知识*, 1986, 32(2): 87 – 90
- [16] 王方海, 龚和. 滞育和非滞育棉铃虫血淋巴类固醇蛻皮素含量变化的比较. *昆虫学报*, 1997, 40(3): 261 – 264
- [17] Suzuki K, Nakamura T, Yanbe T, et al. Termination of diapause in pharate first-instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar japonica* by an imidazole derivative KK-42. *Journal of Insect Physiology*, 1993, 39(2): 107 – 110
- [18] 王方海, 张古忍, 温瑞贞, 等. 入侵害虫蔗扁蛾幼虫期体内蛻皮激素的定性定量分析. *科学通报*, 2006, 51(24): 2870 – 2873
- [19] Tawfik A I, Vedrova A, Li W W, et al. Haemolymph ecdysteroids and the prothoracic glands in the solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43(5): 485 – 493
- [20] 王方海, 张古忍, 温瑞贞, 等. 入侵害虫蔗扁蛾成虫及卵内蛻皮激素的定性定量分析. *中国科学(C辑:生命科学)*, 2008, 38(1): 23 – 27