

棉铃虫(*Helicoverpa amigera* Hübner)滞育蛹和非滞育蛹血淋巴某些生化特性的比较研究^①

王智渝^② 胡敦孝

(昆虫学系)

王宗舜

(中国科学院动物所)

摘要 试验研究了棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴在甘油、氨基酸、脂肪酸以及蜕皮激素含量上的不同。结果表明:1)滞育蛹血淋巴17种游离氨基酸的总量比非滞育蛹增加,其中脯氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸的含量明显高于非滞育蛹,已解除滞育的蛹血淋巴中氨基酸的组成与非滞育蛹仍有所不同,其中丝氨酸、苯丙氨酸、组氨酸的比例明显增加。2)滞育蛹和非滞育蛹血淋巴总脂中的饱和脂肪酸均以棕榈酸为高。不饱和脂肪酸中均以亚油酸含量为高,且滞育蛹的饱和脂肪酸比例高于非滞育蛹。3)血淋巴中甘油的含量两者无显著差异。4)滞育蛹在滞育期血淋巴中20-羟基脱皮酮滴度一直维持在极低水平。当滞育开始解除时,20-羟基脱皮酮的滴度明显上升。

关键词 棉铃虫; 滞育; 血淋巴; 蜕皮激素

中图分类号 Q966

Comparison of Biochemistry Character in Haemolymph of Diapausing and Non-diapausing Pupae of Cotton Bollworm(*Helicoverpa amigera* Hübner)

Wang Zhiyu Hu Dunxiao

(Dept. of Entomology)

Wang Zongshun

(Institute of Zoology, Academic Sinica)

Abstract Studies were carried out to compare the content differences of glycerol, free amino acids, fatty acids and 20-hydroxy-ecdysone titers of haemolymph in diapausing pupae and non-diapausing pupae of cotton bollworm. The results indicated: 1) The total amount of 17 kind of free amino acids were increased in diapausing pupae against non-diapausing pupae. Of them, the content of PRO. ASP. ARG. LYS. were significantly higher in diapausing pupae than non-diapausing ones. The content of SER. PHE. HIS. of diapause-terminated pupae were still higher than that of non-diapausing pupae. 2) Predominant ingredients of fatty acids were palmitate (saturated fatty acid) and linoleate (unsaturated fatty acid) in both kind of pupae of cotton bollworm, but the ratio of saturated to unsaturated fatty acids of diapausing pupae in the haemolymph lipid was more higher than that of non-diapausing ones. 3) The content of glycerol of pupae in haemolymph had no difference between diapausing and non-diapausing pupae. 4) The very low level of 20-hydroxy-

收稿日期: 1996-06-30

①国家自然科学基金资助项目。

②王智渝,北京海淀区圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

ecdysone titers in the haemolymph plays an important role of maintaining diapause condition, its prompt rise signals termination of diapause.

Key words *Helicoverpa amigera* (Hüner); diapause; haemolymph; ecdysone

棉铃虫是农作物上的大害虫,有关它活动阶段的研究为数甚丰,而对其生活史中的表面不活动阶段-蛹期的认识却十分薄弱,蛹期的生理生化特性与其随后发育路径的选择应是存在一定的联系,而以往有关棉铃虫蛹期生理生化特性的研究主要侧重在内分泌系统的研究上;罗马等^[1]探讨了滞育棉铃虫蛹的环核苷酸水平,发现滞育蛹的环-磷酸腺苷(cAMP)水平高于非滞育蛹。朱湘雄^[2]研究了棉铃虫血淋巴中的蜕皮甾类,研究表明在棉铃虫中影响成虫发育的主要激素是20-羟基蜕皮酮。Meola等^[3]对美洲棉铃虫(*Helicoverpa Zea*)的研究表明其滞育过程受促前胸腺激素和存在于脂肪体-血淋巴中的一种体液因子的共同调节,尽管促前胸腺激素能够从脑中释放出来,却不能促进前胸腺合成蜕皮酮,只有在滞育解除温度以上这种体液因子产生之后,才能合成蜕皮酮,导致滞育解除和成虫发育,类似的现象也见于澳洲棉铃虫 *H. Punctigera*^[4]和烟芽夜蛾 *H. Virescens*^[5]。而有关棉铃虫蛹血淋巴的最基本生理生化特征包括碳水化合物、脂肪、游离氨基酸代谢上的特点以及与滞育蛹的差异尚无人研究,搞清它们之间的差异将会为探明棉铃虫蛹期后发育路径的选择打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试虫源取自置于20℃,12h光照条件诱导出的滞育蛹及同一种群在27℃,14h光照下经人工饲料饲养所得的非滞育蛹。将收集的供试虫体用蒸馏水洗净、滤纸吸干后,用解剖针刺破蛹背部,再用毛细管吸取血淋巴,放入已加少量苯基硫脲的500μL离心管中,取样达一定量后保存于-80℃冰箱中待用。

1.2 血淋巴中甘油含量的测定方法

参照Nordin和Yi等^[6]的方法。甘油脱氢酶和β-NAD⁺为美国Sigma公司产品,反应体系为碳酸盐缓冲液0.33mol·L⁻¹;硫酸铵0.03mol·L⁻¹;β-NAD⁺(pH7.0)6.7mmol·L⁻¹;甘油脱氢酶0.06unit;甘油标准或血淋巴样品反应总体积为1mL;pH10.0。在DU Series600紫外分光光度计上进行测定,波长为340nm。

1.3 血淋巴中游离氨基酸的测定方法

参照程振衡等^[7]的方法。取血淋巴100μL于离心管中,加入5%磺基水杨酸溶液500μL,静置15min,4000r/min离心5min,收集上清液。沉淀物再用5%磺基水杨酸溶液400μL冲洗,离心,合并上清液。用0.02NHCL稀释至5mL,再经4000r·min⁻¹离心10min,上清液用日立835-50型氨基酸自动分析仪进行分析。

1.4 血淋巴中脂类脂肪酸的测定方法

血淋巴样品在甲醇:氯仿(1:2)中室温下提取24h,N₂浓缩至极少量时加入20μL 0.5mol·L⁻¹的氢氧化钾/甲醇反应1~3h,再加入20μL己烷,用注射器将溶液混匀,待分层后吸出己烷液,重复3次,合并己烷液,加等体积重蒸馏水混匀,取己烷层,浓缩至1~3μL

后用气相色谱分析脂肪酸组成。气相色谱分析在附有火焰离子化检测器的 Pye Unicam204 气相色谱仪上进行,采用 Split 进样,毛细柱为 25 m×0.22i. d. BP-20(SGE). 起始温度为 80℃,按 4℃/min 程序升温至 200℃,载气为氢气。

1.5 血淋巴中 20-羟基蜕皮酮的放射免疫测定

参照曹梅讯等^[8]建立的 20-羟基蜕皮酮的放射免疫测定方法,并由曹梅讯等提供 β -ecdysone RIA 药箱。

1.5.1 蜕皮甾类的提取 血淋巴用 60%甲醇水溶液抽提后,在 4 000 转/min 下离心 10 min,收集上清液,沉淀用 60%甲醇水溶液再次抽提后于 4 000 转/min 离心 10 min,合并两次的上清液,在 70℃水浴中蒸干后待测。

1.5.2 试剂 含 0.1%明胶的 0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液生理盐水(pH7.0),简称 GPBS,保存于 4℃。1%葡聚糖包活性炭悬浮液,简称 DCC,用 GPBS 配制,现配现用。20-羟基蜕皮酮标准工作液 5 ng/mL。抗血清 Ab(稀释度为 1:100),使用时稀释至 1:10 000。标记抗原*Ag,使用时用 GPBS 稀释到 10 000 cpm/100 μ L 左右。

1.5.3 测定步骤 取 12×75 毫米玻璃试管若干,依次加入 0,25,50,100,200,400,800,1 600 pg 的标准 20-羟基蜕皮酮和样品,每管加 1:10 000 稀释度的抗血清 100 μ L,再加标记抗原 100 μ L(10 000 cpm)左右。另取两管不加抗血清和标记抗原,用 200 μ L GPBS 代替,用作本底测定。再取两管不加抗血清,用 100 μ L GPBS 代替,但加入标记抗原 100 μ L,用作非特异性结合率测定。混匀后,在 FH-408 自动定标器上测定各管的总放射性,然后置 4℃过夜。次日,各管依次加入 400 μ L 1%DCC 液,立即混匀,在 4℃静置 10 min 后,用日立低温离心机于 4℃,3 000 转/min 离心 5 min,弃去上清液,再测定沉淀物的放射性。

2 结果与分析

2.1 滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中甘油含量的比较

本试验测定了棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴甘油含量,结果见表 1。由表 1 可知,棉铃虫滞育蛹和非滞育蛹血淋巴中甘油含量都较低,且二者无明显差别。滞育蛹随着滞育发育的进行,甘油含量略有升高,经 8℃冷处理未见甘油含量的明显增加,可见棉铃虫在越冬过程中并不存在甘油积累的现象。

2.2 棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中游离氨基酸的种类和含量比较

昆虫血淋巴中含有高浓度的游离氨基酸,其总浓度相当于人体血浆中的 100~300 倍,很显然这些过量的游离氨基酸超出了蛋白质合成的需要,表明它还具有其它的功能,就某一种昆虫而言,游离氨基酸的变化受到发育期、食物、生理状态和飞翔活动等多种因子的影响。本试验比较了棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中游离氨基酸的种类和含量,结果见表 2。

从表 2 中可看出非滞育蛹血淋巴中游离氨基酸总量为 12.05 mg·mL⁻¹,滞育蛹总量为 22.38 mg·mL⁻¹,比非滞育蛹增加了 85.7%,滞育解除时游离氨基酸总量下降至 13.55 mg·mL⁻¹,与非滞育蛹接近。棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中都含有 17 种游离氨基酸,二者在组成上不存在质的区别,但滞育蛹的脯氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸的含量明显高于非滞育蛹。从表 2 还可以看出已解除滞育的蛹血淋巴中氨基酸的组成与非滞育蛹仍有所不同,其中

丝氨酸、苯丙氨酸、组氨酸的含量明显增加。

表1 棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴甘油含量的比较

	甘油含量/nmol·L ⁻¹	
	非滞育蛹 NDP	滞育蛹 DP
发育前期(1~2 d)	6.2	20℃滞育 10 d 2.2
发育中期(3~7 d)	8.2	20℃滞育 20 d 4.1
发育后期(8~12 d)	5.9	20℃滞育 30 d 5.0
		20℃滞育 70 d 6.8
		低温(8℃)70 d 7.5

NDP=non-diapausing pupae DP=diapausing pupae

表2 棉铃虫滞育与非滞育蛹血淋巴游离氨基酸的含量

氨基酸种类	氨基酸含量		
	非滞育蛹 NDP	滞育蛹 DP	滞育解除蛹 DTP
天冬氨酸 Asp.	1.07	<u>3.44</u>	1.87
苏氨酸 Thr.	1.17	1.39	0.81
丝氨酸 Ser.	0.14	0.14	<u>0.46</u>
谷氨酸 Glu.	0.14	0.59	0.41
甘氨酸 Gly.	0.17	0.15	0.23
丙氨酸 Ala.	0.17	0.17	0.14
半胱氨酸 Cys.	0.12	0.14	0.15
缬氨酸 Val.	0.60	0.92	0.51
甲硫氨酸 Met.	0.39	0.41	0.39
异亮氨酸 Ile.	0.32	0.42	0.20
亮氨酸 Leu.	0.43	0.62	0.34
酪氨酸 Tyr.	0.12	0.08	0.08
苯丙氨酸 Phe.	0.12	0.10	<u>0.42</u>
赖氨酸 Lys.	1.57	<u>2.91</u>	1.79
组氨酸 His.	1.68	2.13	<u>2.24</u>
精氨酸 Arg.	2.55	<u>4.02</u>	2.34
脯氨酸 Pro.	1.21	<u>4.66</u>	1.08
总合	12.05	22.38	13.55

DTP=diapause-terminated pupae

2.3 棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中脂类脂肪酸组成

本试验比较了棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴脂类脂肪酸的组成,结果见表3。试验表明(表3)滞育蛹与非滞育蛹血淋巴总脂中的饱和脂肪酸均以棕榈酸为高,不饱和脂肪酸中均以亚油酸含量为高,且棉铃虫蛹期血淋巴脂类的脂肪酸组成中,不饱和脂肪酸含量较高,占总脂肪酸含量的一半以上。其饱和/不饱和脂肪酸的比率滞育蛹为87.62%,非滞育蛹为67.10%,滞育蛹的饱和脂肪酸比例高于非滞育蛹。

表 3 棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中脂类脂肪酸的组成

脂肪酸	百分率	
	滞育蛹 DP	非滞育蛹 NDP
肉豆蔻酸 14:0 Myristic acid	0.85	0.56
棕榈酸 16:0 Palmitic acid	41.67	34.47
硬脂酸 18:0 Stearic acid	4.18	5.13
棕榈油酸 16:1 Palmitoleic acid	2.20	3.04
油酸 18:1 Oleic acid	16.47	17.52
亚油酸 18:2 Linoleic acid	24.21	27.37
亚麻酸 18:3 Linolenic acid	10.42	11.92
饱和/不饱和脂肪酸的比率 U/S	87.62	67.10

U=unsaturated fatty acids. S=saturated fatty acids.

2.4 棉铃虫滞育蛹与非滞育蛹血淋巴 20-羟基蜕皮酮滴度的变化

对棉铃虫而言,蛹血淋巴中蜕皮酮是原激素,主要的蜕皮甾类是 20-羟基蜕皮酮,同样情况也见于美洲棉铃虫 *H. zea*。本试验对棉铃虫滞育蛹和非滞育蛹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮进行了放射免疫测定,结果见图 1 和图 2。由图 1 可知,棉铃虫非滞育蛹蛹前期血淋巴中 20-羟基蜕皮酮滴度为 132 pg/ μ L,随蛹发育逐渐上升,到蛹期第 6 d 达到高峰(271 pg/ μ L),第 10 d 后下降到较低水平(74 pg/ μ L),整个蛹期仅出现一个 20-羟基蜕皮酮的峰,这种趋势与其它昆虫的情况是一致的。图 2 表明棉铃虫滞育蛹在滞育期中 20-羟基蜕皮酮滴度维持在极低水平(13~18 pg/ μ L),经冷处理 70 d 后没有上升(仍为 18 pg/ μ L),这说明滞育发育的完成必须在一定的温度阈值以上。将滞育蛹置于 27 $^{\circ}$ C 高温下解除滞育,当滞育蛹后颊部位眼点移向侧面时,血淋巴中 20-羟基蜕皮酮的滴度由 29 pg/ μ L 上升到 133 pg/ μ L,滴度的迅速上升标志着滞育的解除,同时表明滞育蛹眼点的消退可以作为预成虫发育的可靠依据^[9]。

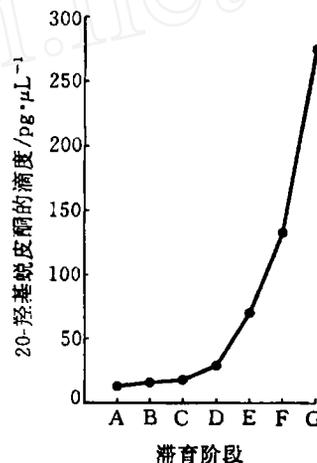


图 1 棉铃虫非滞育蛹蛹期血淋巴 20-羟基蜕皮酮滴度

3 讨论与结论

大多数冬滞育的昆虫都会在体内合成和积累抗寒物质,而昆虫越冬抗寒的有关物质中,最常见的是甘油,亚洲玉米螟滞育幼虫在冷诱导下,血淋巴中甘油浓度的上升十分明显,其幼虫的滞育属糖醇积累型的^[10]而该试验证明棉铃虫的滞育不是糖醇积累型的,滞育棉铃虫血淋巴中的甘油含量低,且在冷处理后,未见甘油含量的增加。脂类是昆虫贮存能量的场所,特别是昆虫长距离迁飞时所必需的,棉铃虫血淋巴脂类脂肪酸的特点是滞育与非滞育蛹血

淋巴的饱和脂肪酸中均以棕榈酸为高,分别占总脂的 41.67%和 34.4%,不饱和脂肪酸中是亚油酸含量高分别占总脂的 24.21%和 27.37%。且滞育蛹的饱和脂肪酸比例较高,其饱和/不饱和脂肪酸比例滞育蛹为 87.6%;非滞育蛹为 67.1%,而一般温带地区滞育的昆虫其不饱和脂肪酸的含量要大于饱和脂肪酸^[11]。

棉铃虫在碳水化合物和脂类代谢上与通常温带地区滞育昆虫相反的结果在一定程度上说明了滞育的棉铃虫蛹抗寒的生化基础不足,它仍具有原产热带和亚热带的特性^[12],只有在冬春温暖的条件下才能提高滞育与非滞育蛹的越冬存活率以及滞育蛹的发育质量。1992~1994年棉铃虫在华北地区的大发生和这期间冬春温度的普遍升高有很大的关系,以河北省为例,1991年12月份气温较历年偏高 1~3℃,1992年1月下旬和2月下旬分别较历年偏高 3~5℃和 5~8℃,1993年亦然^[13],这为棉铃虫滞育与非滞育蛹的过冬提供了很好的条件,为来年的大发生准备了充足的虫源。

氨基酸为昆虫合成结构蛋白和酶的原料,通常滞育虫期血淋巴游离氨基酸的总量高于非滞育虫期,棉铃虫滞育蛹血淋巴中 17 种游离氨基酸的总量比非滞育蛹增加了 85.7%,其中脯氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸的含量明显高于非滞育蛹。脯氨酸在植物中的增多被认为是抗干旱的一种表现。Wilson^[14] 1991 年曾报道棉铃虫在澳大利亚 Ord 地区有夏季滞育现象,这从一个侧面可以看出棉铃虫的蛹具有在干旱季节潜伏不出的物质基础。滞育蛹天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸含量的明显增高,它们与滞育有关的功能尚不清楚,在高等动物中天冬氨酸的增多,有利于三羧酸循环,精氨酸的增多有利于激素的分泌,赖氨酸的增多能促进脂肪代谢^[15]这在一个侧面说明棉铃虫滞育蛹为随后的滞育解除做了一定的准备。试验同时表明了解除滞育的蛹血淋巴中氨基酸的组成与非滞育蛹仍有所不同,其中丝氨酸、苯丙氨酸、组氨酸的比例明显增加,在高等动物中这些氨基酸的作用尚可明了,但在昆虫中的作用还了解不清,但可以看到棉铃虫蛹滞育解除后与非滞育蛹在氨基酸原料供应上的差异是随后发育进程会产生差异的原因之一。

滞育蛹血淋巴中 20-羟基脱皮酮一直维持在极低水平(13~18 pg/ μ L),滞育解除时 20-羟基脱皮酮含量迅速上升,这再次证明 20-羟基脱皮酮的合成与成虫发育密切相关,而在棉铃虫滞育期 20-羟基脱皮酮的合成受到明显地抑制。

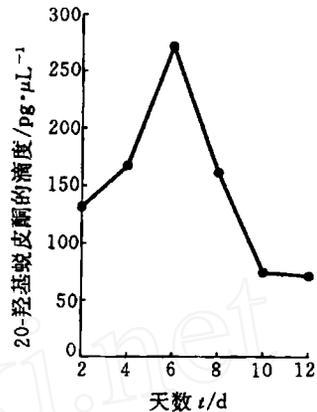


图2 棉铃虫滞育蛹及滞后发育蛹血淋巴 20-羟基脱皮酮的滴度

注:A,B,C分别为滞育蛹在 20℃下 15 d,30 d,70 d;D为后颊部位眼点清晰存在;E为眼点逐渐模糊,但未移向侧面;F为眼点移至侧面;G为眼点消失。

参 考 文 献

- 1 罗马,郭鄂,马世骏. 光周期诱导棉铃虫滞育的生化基础. 生态学报, 1983, 31: 131~140
- 2 朱湘雄,陈志辅. 棉铃虫蛹期血淋巴的脱皮甾类. 昆虫学报, 1986, 29(4): 345~349

- 3 Meola R W, Kaska H. Gray R. Physiological changes associated with stemmatal pigment retraction in pupae of *Heliothis zea*. Southwestern Entomol, 1983,8(3):226~230
- 4 Browning T O. Ecdysteroids and diapause in pupae of *Heliothis punctigera*. J Insect Physiol, 1981,27:715~719
- 5 Loeb M J. Diapause and development in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*; a comparison of haemolymph ecdysteroid titers. J Insect Physiol, 1982,28(8):667~673
- 6 Yi S X, Yin C M, Nordin J H. The in vitro biosynthesis and secretion of glycerol by larval fat bodies of chilled *Ostrinia nubilalis*. J Insect Physiol. 1984,33(7):523~528
- 7 程振衡,江仲明. 亚洲玉米螟血淋巴游离氨基酸的测定. 昆虫学报,1983,26(4):465~469
- 8 曹梅讯,朱湘雄,陈志辅,夏克敏. 20-羟基蜕皮酮的放射免疫分析法及其在蓖麻蚕蛹上的应用. 昆虫学研究集刊,1980,1:1~6
- 9 王智渝,胡敦孝,王宗舜. 棉铃虫滞育与非滞育蛹外部特征与雌性内生殖系统发育的比较研究. 动物学集刊,1995,12:49~52
- 10 伊淑霞,白成. 冷诱导亚洲玉米螟产生甘油的研究. 昆虫学报,1991,34(2):129~134
- 11 Isama Shimizu Comparison of fatty acid compositions in lipids of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori* (Lepidoptera; Bombycidae). Comp Biochem Physiol, 1992,102B:713~716
- 12 钦俊德. 有关棉铃虫试验研究的几个问题. 昆虫知识,1960,(5):160~16
- 13 戴小枫,郭子元. 棉铃虫大暴发的成因分析. 植物保护,1993,19(4):35~37
- 14 Wilson A G L. Overwintering and spring emergence of *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Namoi Valley New South Wales. Bull ent Res, 1979,69:97~109
- 15 吴显荣. 氨基酸营养. 氨基酸杂志,1988,(2):21~28