

七星瓢虫雌成虫咽侧体的活性

关雪辰 陈娥英

(中国科学院动物研究所)

摘要 以短期体外放射化学测定法测定了七星瓢虫雌成虫的咽侧体(CA)活性。结果表明,七星瓢虫的CA在TC 199培养液中培养时活性最高。在最适培养条件下CA合成保幼激素(JH)的速度在1—4小时呈直线增加。

七星瓢虫雌虫生殖期CA的活性变化与卵黄发生有相关性。羽化初期CA活性很低,羽化后4—8天CA活性增加,卵母细胞内卵黄沉积开始增多;羽化后8—12天CA活性高峰出现,此时卵母细胞内有大量卵黄沉积;羽化后12—15天CA活性下降,卵完全成熟并陆续出现产卵个体。

食料对七星瓢虫成虫的卵黄发生的影响:取食人工饲料雌虫的CA活性增长缓慢,直至羽化后15天CA活性仍很低,因而抑制了卵黄原蛋白的合成,使卵巢发育缓慢。此种雌虫中CA活性高峰的出现比取食蚜虫的延迟约2倍,前者的产卵前期也较后者延长约2倍。

关键词 七星瓢虫 咽侧体活性 卵黄发生 卵黄沉积 人工饲料

前 言

昆虫的咽侧体(CA)是合成保幼激素(JH)的部位,这种合成保幼激素的能力一般称为咽侧体活性(CA activity)。除了部分鳞翅目昆虫外,CA对雌虫的生殖证明是必不可少的并在许多昆虫中证实雌虫CA活性与生殖活动之间的相关性(De Kort 和 Granger, 1981)。如美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的卵巢发育是受CA活性的调节(Weaver等, 1977)。

虽然早在1936年Wigglesworth就首先发现CA在雌虫生殖中的重要性,以后在将近半个世纪中已积累大量资料证明昆虫CA分泌的JH在生殖中起关键作用(Gilbert等, 1973、1978; de Wilde 和 De Loof, 1973; Doane, 1973),但有关JH作用机制的资料却很少。这主要因为阐明体内的作用试验比较困难。例如在昆虫需用JH或JH类似物的定量试验中,所用的外源JH可能与体内其它激素如蜕皮激素或神经分泌激素相互作用(Masner, 1976),或被迅速转化与降解,并也可能干扰内分泌系统的反馈作用。所以要阐明JH在昆虫生殖中的作用,用离体培养的方法,可以克服上述的缺点。普通以测量CA体积的变化来表示CA活性,但此法有明显的局限性,如在沙蝗 *Schistocerca gregaria* 中CA体积和JH合成之间并没有相关性(Tobe 和 Pratt, 1975)。1974年Pratt和Tobe以及Tobe和Pratt建立了短期离体放射化学测定法,直接测定CA活性,为研究CA中JH合成的途径以及JH合成的调节开辟了新的可能性,我们用这种方法研究了七星瓢虫雌虫生殖活动期CA活性变化与卵巢发育的关系,对离体条件下测定CA活性的最佳条件进行了测试,并选择了培养CA的较好的培养液。此外测试了不同培养时

本文于1984年2月收到。

本工作承祖启慰副教授指导帮助并修改文稿,钦俊德教授对文稿提出宝贵意见,李福兴同志协助部分工作,特此致谢。

间 CA 活性的变化,从而选择出 CA 活性达最高时的培养时间。虽对 CA 所合成的 JH 未经层析法进行鉴定,但在前人工作的基础上以 CA 培养液的提取物放射性的测定值来表示 JH 合成的相对量应是可行的。

很多研究已表明,食物对于雌虫一方面是卵黄发生的物质基础,另一方面是激活脑神经分泌系统的信号,由此影响 CA 的分泌活动和卵的发育。为了查明不同食料对 CA 活性和卵巢发育的影响,我们对取食蚜虫及取食人工饲料的雌虫生殖活动期的 CA 活性变化进行了测定。

材料与方 法

1. 材料 1983 年 3 月和 5 月末自北京近郊麦田采集七星瓢虫第一代蛹。在室内羽化后分别以菜蚜和人工饲料(鲜猪肝、蔗糖 5:2 w/w)饲养。

TC 199 和 DMEM (Dulbecco's Eagle Medium) 培养基为美国 Gibco 生产, Grace 昆虫培养基为美国 KCB 生产。用重蒸馏水配制成水溶液。

[甲基- ^3H] 甲硫氨酸 比强 15 居里/毫克分子,英国放射化学中心产品。

丁基-PBD [2-(4-t-butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole] 闪烁剂 瑞士 Fluka 生产。

HEPES 缓冲剂 瑞士 Fluka 生产。

2. 方法 CA 活性的测定方法参阅 Feyereisen 和 Tobe(1981)所报道的昆虫 CA 释放 JH 的快速测定方法作了适当修改。简要步骤如下:在生理盐液中解剖瓢虫,取出连有心侧体的 CA,放在 100 微升 TC 199 培养液内。培养液内含有 25 毫克分子 HEPES 缓冲剂,10 毫克/毫升 Ficoll 400 (Sigma) 及 [甲基- ^3H] 甲硫氨酸(最终比活 38 毫克分子,最终浓度 0.28 毫克分子)。5—10 对 CA 在上述培养液内于 30℃ 培养 3 小时,同时设对照,即培养液中没有 CA。培养后将 300 微升异辛烷加入培养液中并充分混合,于 3,000g 离心 5 分钟。CA 新合成并释放到培养液内的甲基标记的 JH 被定量地提取到异辛烷相内。然后取定量的提取液加入到盛有 5 毫升丁基-PBD 闪烁液的闪烁瓶内(闪烁液配法,甲苯中含 1% 丁基-PBD, 10% 乙醇, 5 毫克分子浓度乙酸)。用 LKB 液闪计数测定其放射性,以每分钟的脉冲数 (cpm)表示。

结 果

一、不同培养液中咽侧体的活性 用 TC 199, Grace's 和 DMEM 三种不同的组织培养液培养 CA,每种培养液的 pH 值为 7,并以 5 对 CA 重复培养 2—3 次,经测定后取其平均值列于表 1。结果表明在 TC 199 培养液中所培养的咽侧体活性最高。

表 1 不同培养液中咽侧体的活性

批 号	L-[甲基- ^3H] 甲硫氨酸掺入 CPm/5对CA/3小时		
	TC 199	Grace's	DMEM
1	1580	555	235
2	700	295	75

第一和第二批昆虫所测数值差异较大,因两批昆虫采集时间及饲养温度不同以及个体差异所致。TC 199 培养液所培养的 CA 活性为 Grace's 的 2.5 倍,为 DMFM 的 8 倍。根据上述结果,我们在以下的实验中均采用 TC 199 培养液。

二、不同培养时间咽侧体合成 JH 速率的变化

将 10 对 CA 在含 [甲基-³H] 甲硫氨酸的培养液中进行培养,每 1 小时取出培养液测定 JH 中放射性的掺入。CA 在加入新的培养液后继续进行培养。如此测得 CA 在不同时间合成并释放 JH 的速率。从图 1 可以看到,在体外培养条件下,CA 合成有一个较长的延缓期。1 小时后很快上升,在 4 小时内呈直线增长。到 6 小时合成速率增加不大。因此,我们在以后的实验中培养时间一般为 3 小时。

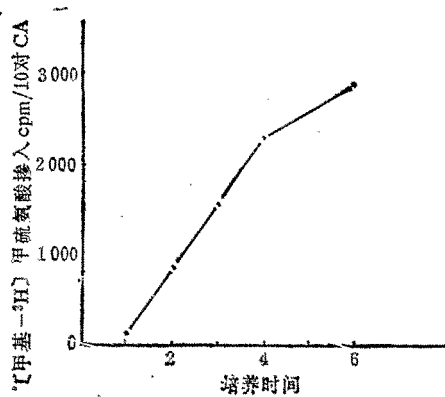


图 1 不同培养时间咽侧体中 JH 的合成 (河南省安阳县农业局等, 1979)。

三、咽侧体活性与卵巢发育的关系

根据卵巢管的发育情形及卵黄蛋白沉积的多少可将七星瓢虫的卵巢管分为四级: I 级为新羽化成虫卵巢管,无明显的卵室分化;II 级有明显卵室分化;III 级有 2 个卵室,有卵黄沉积,卵粒未成熟;IV 级有 2—3 个卵室,有成熟或将成熟的卵粒

新羽化的雌虫咽侧体的活性较低,此时卵巢为 I 级。羽化后喂食蚜虫约 4—8 天时咽侧体活性增加,卵巢由 I 级发育至 II 级,卵黄沉积逐渐增多。羽化约 8—12 天时,出现咽侧体活性高峰,此时卵巢管发育至 III 级,有大量卵黄沉积,卵即将成熟。羽化约 12—15 天后咽侧体活性下降,卵巢发育至 IV 级,并陆续出现产卵个体 (见图 2)。

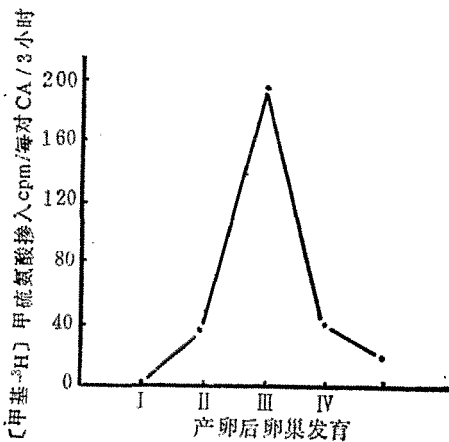


图 2 咽侧体活性与卵巢发育的关系

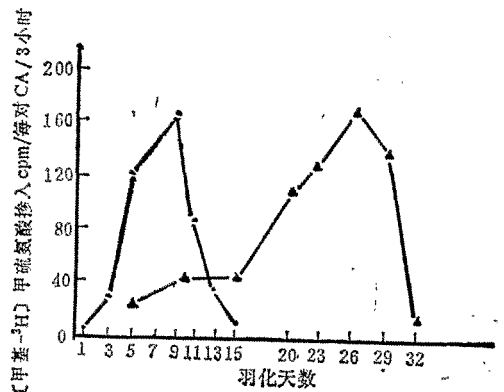


图 3 不同食料对咽侧体活性的影响
●——● 蚜虫 ▲——▲ 人工饲料

四、取食不同食料对咽侧体活性的影响

喂食蚜虫的雌虫羽化 1、2 天时咽侧体活性很低。3 天后咽侧体活性显著增加。9 天

时咽侧体活性最高。11 天咽侧体活性开始下降,15 天时降至羽化初期的低水平(图 3)。这与卵巢发育不同阶段所测咽侧体活性的变化规律是一致的(图 2)。

以“肝、糖”人工饲料喂食新羽化的雌虫后,5 天至 15 天咽侧体活性增长缓慢。20 天后咽侧体活性明显增加,26 天时咽侧体活性最高。此后咽侧体活性下降(图 3)。

此外,取食人工饲料的雌虫卵巢发育缓慢。15 天时卵巢发育仍停滞在 II 级。15 天至 20 天时卵巢逐渐由 II 级发育至 III 级,卵黄沉积逐渐增多。32 天时卵巢发育为 IV 级,并开始产卵。因此,在取食人工饲料的雌虫中,CA 活性变化的规律是与其卵巢发育的特点密切相关的。

讨 论

Pratt 和 Tobe (1974) 所建立的短期体外放射化学测定法是测定离体 CA 中 JH 生物合成自发速率的一种简便方法。多年来这种方法已应用于研究 JH 生物合成与 JH 的释放,卵母细胞的发育和血淋巴中 JH 滴度之间的关系。研究 CA 活性的调节,对揭示 CA 中 JH 生物合成的途径起了重要作用(Khan 等,1982)。我们首次将此法用于七星瓢虫 CA 活性的测定,并用石蜡切片观察其组织学特征确认其为 CA 腺体。为了避免损伤 CA,我们是将 CA-CC 复合体一起培养的。CC 单独进行培养不显示活性。

Tobe (1980) 指出应用他们所建立的方法测定其它昆虫种类的 CA 活性,应该先确定一些基本参数,包括所合成 JH 的鉴定、JH 合成与分泌的关系、培养条件等等。我们在应用这种方法测定七星瓢虫 CA 活性之前,曾对底物浓度、pH 培养液的组分,以及培养期间 JH 合成的直线性等进行了测定,在此基础上选定了最适条件。根据现有资料,CA 合成 JH 后并不贮存在腺体内,而是立即分泌到血淋巴中(Riddiford 和 Truman,1978),因此我们没有对 CA 腺体本身进行测定。因实验条件所限对七星瓢虫的 JH 我们尚未进行过鉴定,本实验结果以 cpm 表示。

咽侧体所分泌的保幼激素对雌性生殖腺的发育是不可缺少的。如果没有咽侧体,卵母细胞的生长和发育即停止(Engelman,1970)。在许多昆虫中已证明卵黄发生,包括卵黄原蛋白的合成、分泌和被卵母细胞的摄取,是受 JH 调节的(龚和、翟启慧,1979)。我们的试验表明,七星瓢虫卵巢的发育成熟是受咽侧体激素控制。

昆虫的营养对生殖腺的发育起着决定性作用,这种关系是通过内分泌来调节的。蜚蠊 *Nauphoeta cinerea* 在羽化后和产卵后都取食大量食物,取食活动与咽侧体活动呈相关现象(Bühmann,1976)。我们的结果表明,取食人工饲料雌成虫的咽侧体活性增长缓慢,直至羽化后 15 天时咽侧体活性仍很低,因而抑制了卵黄原蛋白的合成以致使卵巢发育缓慢。这与取食人工饲料时取食量太低(陈志辉等,1980)有关。取食人工饲料的雌虫在 32 天后才出现产卵个体,而取食蚜虫的雌虫羽化后 12 天即可陆续产卵,比前者的产卵前期提早约 2 倍时间。取食蚜虫的雌虫在 9 天时咽侧体活性最高,而取食人工饲料雌虫咽侧体活性最高是在 26 天,比食蚜虫组延迟约 2 倍时间,说明咽侧体的活性与取食不同饲料有关,但两组雌虫咽侧体活性的高峰值近似。

参 考 文 献

- 龚 和 翟启慧 1979 昆虫卵黄原蛋白和卵黄发生。昆虫学报 22(2): 219—36。
- 陈志辉等 1980 食料对于七星瓢虫取食和生殖的影响。昆虫学报 23(2): 141—8。
- 河南省安阳县农业局等 1979 七星瓢虫的利用。农业出版社。
- Bühmann, G. 1976 Hemolymph vitellogenin, juvenile hormone, and oocyte growth in the adult cockroach *Nauphoeta cinerea* during first pre-oviposition period. *J. Insect Physiol.* 22: 1101—10.
- Doane, W. W. 1973 Role of hormones in insect development. In: Development systems: Insects, S. J. Counce, C. H. Waddington, (ed) Vol. 2, 291—497.
- Engelman, F. 1970 Hormonal control of egg maturation. In: The physiology of Insect Reproduction, 143—89.
- Feyereisen, R. and Tobe, S. S. 1981 A rapid Partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. *Anal. Biochem.* 111: 371—5.
- Gilbert, L. I. et al. 1978 Regulation of juvenile hormone titer in Lepidoptera. In Comparative Endocrinology, ed. P. J. Gaillard, H. H. Boer, pp. 47—86. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedical.
- Gilbert, L. I. and King, D. S. 1973 Physiology of growth and development: endocrine aspects. In the Physiology of Insecta, ed. M. Rockstein, 249—370.
- Khan, M. A. et al. 1982 Improved assay conditions for measurements of corpus allatum activity *in vitro* in the adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* 28: 279—84.
- Kort, de C. A. D. and Granger, N. A. 1981 Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 1—28.
- Masner, P. 1976. Ecdysone deficiency in juvenile hormone reared larvae of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). In: The Juvenile Hormones, ed. L. I. Gilbert, pp. 234—51. New York/London: Plenum.
- Pratt, G. E. and Tobe, S. S. 1974 Juvenile hormones radiobiosynthesized by corpora allata of adult female locusts *in vitro*. *Life Sci.* 14: 575—86.
- Riddiford, L. M. and Truman, J. W. 1978 Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. In: Biochemistry of Insects. M. Rockstein (ed) 307—57.
- Tobe, S. S. and Pratt, G. E. 1974 The influence of substrate concentrations on the rate of insect juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the desert locust *in vitro*. *Biochem. J.* 144: 107—13.
- Tobe, S. S. and Pratt, G. E. 1975 The synthetic activity and glandular volume of the corpus allatum during ovarian maturation in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Life Sci.* 17: 417—22.
- Tobe, S. S. 1980 Regulation of the corpora allata in adult female insects. In: Insect Biology in The Future. M. Locke and D. S. Smith (eds) 345—67.
- Weaver, J. et al. 1977 The effect of enforced virginity and subsequent mating on the activity of the corpus allatum of *Periplaneta americana* measured *in vitro*, as related to changes in the rate of ovarian maturation. *Physiol. Entomol.* 2: 59—76.
- Wigglesworth, V. B. 1936 The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus*. *Quart. J. Micro Sci.* 79: 91—121.
- Wilde, de J. and De Loof, A. 1973 Reproduction-endocrine control. In: Physiology of Insecta, M. Rockstein. (ed) Vol. 1, 2nded. 127—57.

CORPUS ALLATUM ACTIVITY IN THE FEMALE *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA* L. ADULTS

GUAN XUE-CHEN CHEN E-YING

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

The *in vitro* corpus allatum (CA) activity in the female *Coccinella septempunctata* L. adult beetles was investigated with a short-term radiochemical assay. The results are as follows:

1. As a preliminary test, the CA activity was measured in three different commercial tissue culture media, i.e. TC 199, Grace's and DMEM. The result showed that the highest CA activity could be obtained in TC 199 culture medium which was used throughout the present work.

2. The JH synthetic capacity of the isolated CA from reproductively active female beetles was measured at different incubation periods. The rate of JH synthesis by isolated CA (based on the incorporation of [methyl-³H] methionine) was linear over a period of 4 hr. Thus CA were incubated in most cases for a period of 3 hr. in the present work.

3. There was a correlation between the CA activity and oocyte growth. CA activity was low when the ovary was in the developmental stage I, then the activity increased in the stage II when yolk deposition increased continuously and the CA activity reached the peak when the ovary was in the stage III and the deposited yolk in the oocytes was abundant. The CA activity decreased rapidly when ovary was in the stage IV or after the first egg mass was laid.

4. When the adult beetles were fed with an artificial diet, the CA activity increased slowly until the 15th day. In these female adult beetles vitellogenesis was retarded and they started oviposition after 32 days, in contrast to the condition when they were fed with aphids, the oviposition would start about on the 12th day. In the former case, the preovipositional period was greatly prolonged, and the peak of CA activity appeared much later.

Key words *Coccinella septempunctata*—corpus allatum activity—vitellogenesis—yolk deposition—artificial diet