

光周期诱导棉铃虫滞育 的生化基础

罗 马 郭 郭 马世骏

(中国科学院动物研究所)

滞育,是有规律地发生在昆虫的某一世代中某一虫态的一种生理生态特性,是昆虫种群适应不良环境的一种生理过程。由于其重要性而得到了生态学家、生理学家、物候学家们的极大重视。通过大量研究,对环境因素诱导、保持和终止滞育的作用,对激素调节滞育的作用,已经有了基本的认识。肯定了光周期和温度是诱导、保持和终止滞育的主要环境因素,并初步认为不同虫态的滞育是由不同的内分泌链索调节的(郭郭,1979)。研究还发现,滞育昆虫在核酸代谢、蛋白质合成代谢、碳水化合物代谢、游离氨基酸的量与格型方面都与发育昆虫间存在差异。随着现代生物学的发展,数学、物理、化学对生物学的渗透,对昆虫滞育机理的研究正进入高一级的水平。

昆虫滞育的诱导,一般是环境因素对其某一虫态发生影响,在下一虫态或隔一虫态,才发生滞育。即,昆虫在一定的发育阶段中累积了环境信息,这种环境信息的反应在发育的一定阶段表达出来,昆虫就进入滞育。环境因素通过何种机制,何种途径影响昆虫的神经内分泌系统?如何在昆虫体内累积、贮存、进而使昆虫对环境的适应成为一种遗传学特征的?这个问题的解决涉及到神经生物学,神经内分泌学、分子生物学、分子遗传学等多方面的研究。由于对昆虫环核苷酸的大量研究证实了环核苷酸作为神经传递介质的第二信使,在神经传导中发挥了重要作用(Bodnaryk, 1979; Finlayson等, 1977; Nathanson等, 1977; Taylor, 1979),作为激素的第二信使介导了很多多肽激素的作用并影响到蜕皮素和保幼激素的作用(Everson等, 1977; Gade, 1979; Leenders等, 1970),并且在昆虫的发育变态(Achazi, 1977; Gelman, 1978)、基因表达(Hashimoto, 1976; Spruill 1978; Rensing等, 1972)等方面也发挥了重要作用。而且,初步研究发现,环核苷酸与光周期打破柞蚕滞育(Rasenick等, 1978)、披肩粘虫滞育终止后成虫脑分化(Bodnaryk, 1978)以及终止麻蝇滞育(Denlinger等, 1978)有密切关系。因此,在环境因素诱导、保持和解除昆虫滞育的过程中,环核苷酸可能发挥了重要作用。但是目前尚没有研究证实光周期诱导昆虫滞育的过程中,环核苷酸体系的作用。

* 本试验过程中,得到中国科学院上海生化所四室许廷森同志的指导,上海昆虫所杨平澜同志的关心。上海生化所王还珠、林南琴、苏妙根等同志的热情帮助,并提供了 $^3\text{H-cAMP}$ 、蛋白激酶等试剂。复旦大学生物系提供棉铃虫。上海生化所谢伟军、王小玉同志,上海昆虫所邹柏祥、何金林同志,以及同位素实验室同志的大力支持和协助。动物研究所龚佩瑜同志关心和帮助,并协助画图。在此一并致谢。

迄今,对诱导棉铃虫滞育的生态条件已进行了较清楚的研究,表明在20—21℃恒温条件下,短光照或逐渐减少光照,可使棉铃虫种群的88.9—93%的个体进入滞育(Wellso等,1977;李超等,1981)。随着纬度每增加5°,昆虫进入滞育的临界光周期增加1—1.5小时(Beck,1980)¹⁾。因此,本文以此为基础,研究光周期诱导滞育的过程中,棉铃虫幼虫整体环核苷酸水平的变化,以及滞育蛹脑、脂肪体的环核苷酸水平,进而探讨光周期诱导棉铃虫滞育的生化基础。

一、材料和方法

1. 棉铃虫虫源由上海复旦大学生物系提供。
2. 试验用棉铃虫用人工饲料²⁾,按下表所列条件饲养(见表1)。

表1 棉铃虫饲养的温度及光照条件

光照L:D (小时) 组别	发育阶段 卵(25℃)	幼虫(21℃)			蛹滞育率
		1—10天	11—20天	21—化蛹	
处理组	12:12	12:12	11:13	10:14	71%
对照组	12:12	12:12	12:12	12:12	13%

3. 试剂 ^3H -cAMP 由北京原子能所标记。蛋白激酶由上海生化所五室提供。 ^3H -cGMP 等测定试剂均为上海市第二医学院同位素实验室生产的 cGMP 放射免疫试剂箱中的试剂。

4. 取材 自改变光照后开始取材,取材时间为改变光照后1、2、4、6、8天,每处理均取2组,每组10条。取材时将幼虫置于干冰中迅速冷冻,然后装在塑料瓶内,封存于干冰中。蛹于化蛹后第4、7、11天取材,按Phillips等(1966)的方法分滞育和发育,雌和雄。取材时迅速剪开头部,取出蛹脑置于干冰中的小塑料管内。用毛细管吸取血淋巴,置于干冰中的另一小管内。挤出脂肪体于滤纸片上,清除其它组织后,也置于干冰中的小管内保存。

5. 样品制备:称重后,将组织放入冰浴中的玻璃匀浆器里,加入1毫升冰冷的过氯酸(1N),同时加入测回收率用的 ^3H -cGMP和 ^3H -cAMP约各2000—3000cpm,于冰浴中匀浆(3000—4000转/分)3分钟,然后离心10分钟(3000转/分),分出上清液。用2N KOH将上清液调至中性,离心10分钟(2000转/分),去沉淀,上清液分出保存。

柱层析法分离cAMP和cGMP。将处理好的阴离子交换树脂(Dowex 1×8, 200—400目)装成7×40毫米的小柱,将上述上清液上柱。样品上柱后,先用10毫升重蒸水洗,然后

1) 北京地区纬度为39°56', 上海地区纬度为31°12'。

2) 人工饲料配方如下:麦胚粉23克,玉米粉30克,酵母粉22克,可溶性淀粉36克,多维葡萄糖25克,维生素C4克,尼泊金2克,山梨酸1克,琼脂16克,加水到1000克。

用2N甲酸8毫升洗脱,收集2—7毫升为cAMP部分。然后用4N甲酸11毫升洗脱,收集2—11毫升为cGMP部分。将收集到的两部分真空干燥,待测。

6. cAMP测定 采用竞争性结合蛋白法测定。按照刘景生(1980)的方法,稍有改变。即采用微孔滤膜(0.45微米)分离游离和结合的cAMP。膜片于红外灯下烘干后,置于装有5毫升闪烁液的闪烁杯中,在液体闪烁计数器上作放射性测量。

7. cGMP测定 采用放射免疫法。按照上海第二医学院和上海市中医研究所建立的方法进行(见上海第二医学院药厂,cGMP放射免疫药箱说明书)。

二、结 果

1. 不同光照条件下的幼虫整体环核苷酸水平

不同光照处理下的幼虫整体环核苷酸水平变化有较明显的差异(图1.2)。第一次改变光照后一天,处理组的cAMP和cGMP水平都大大高于对照组。cAMP水平比对照组高3.4倍,cGMP水平比对照组高2.8倍。改变光照后第二天,处理组的cAMP和cGMP水平陡然下降到低于对照组的水平。第二次改变光照一天后,处理组的cAMP和cGMP水平与对照组差异不大。

2. 滞育蛹和发育蛹脂肪体的环核苷酸水平

结果表明,在雌蛹脂肪体中,cAMP和cGMP水平在发育和滞育之间存在明显差异。滞育蛹脂肪体的cAMP水平为发育蛹的2.05—2.67倍,发育蛹的cGMP水平为滞育蛹的1.4—3.44倍。在雄蛹中,发育蛹脂肪体的GMP水平高于滞育蛹,为滞育蛹的1.43—2.30倍,而cAMP水平则只在化蛹后第四天,滞育为发育的1.52倍,以后则无多大差异。这与雌蛹的结果不太一致(见表2、3,图3、4、5、6)。

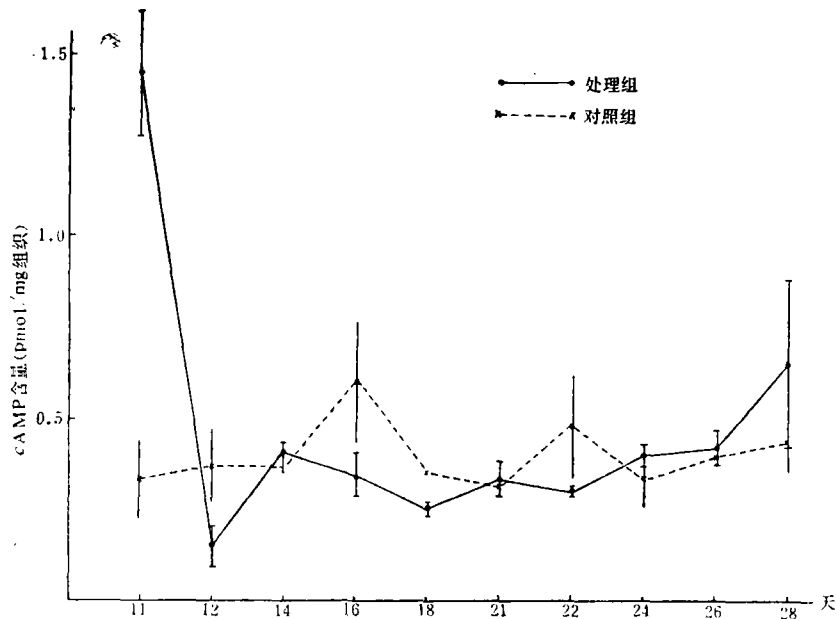


图1 不同光照条件下棉铃虫幼虫整体的cAMP水平

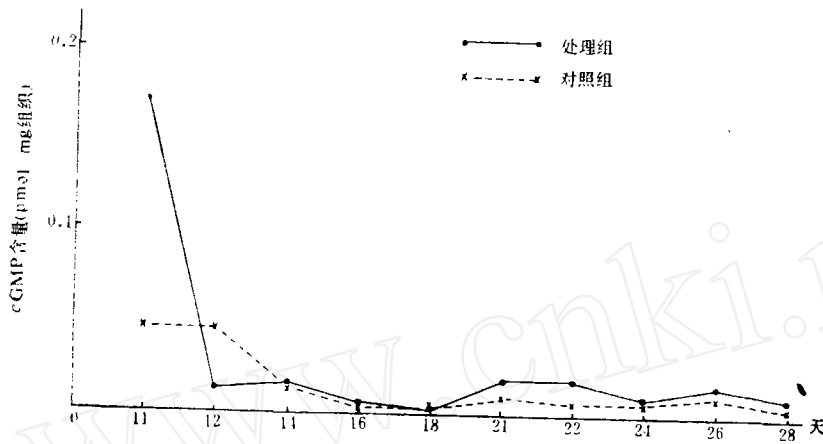


图 2 不同光照条件下棉铃虫幼虫整体的 cGMP 水平

表 2 棉铃虫滞育蛹与发育蛹脂肪体、脑的 cAMP 水平比较

组织	cAMP (pmol/组织)	滞 育		发 育		比 率			
						滞 育:发 育		♀:♂	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	滞 育	发 育
脂肪体 (pmol/mg 组织)	第 4 天	0.47	0.32	0.18	0.21	2.60	1.52	1.47	0.86
	第 7 天	0.37	0.18	0.18	0.15	2.05	1.20	2.05	1.20
	第 11 天	0.56	0.21	0.21	0.22	2.67	0.95	2.67	0.95
脑 (pmol/脑)	第 4 天		1.55		0.7		2.21		
	第 7 天		0.65		0.48		1.35		
	第 11 天		1.43		0.34		4.20		

表 3 棉铃虫滞育蛹与发育蛹脂肪体的 cGMP 水平比较

组织	cGMP (pmol)	滞 育		发 育		比 率			
						发 育:滞 育		♀:♂	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	滞 育	发 育
脂 肪 体 (pmol/mg 组织)	第 4 天		0.074		0.107		1.45		
	第 7 天	0.100	0.044	0.140	0.082	1.40	1.86	1.71	2.27
	第 11 天	0.054	0.050	0.186	0.115	3.44	2.30	1.61	1.08
脑 (pmol/脑)						滞 育:发 育			
	第 4 天		0.26		0.09		2.89		
	第 7 天		0.1		0.07		1.44		
	第 11 天		0.15		0.05		3.00		

很多研究表明,细胞组织中的 cAMP 水平与 cGMP 水平之间的比率,对于细胞的很多生理变化是很重要的 (Goldberg 等, 1974)。因此,我们在表 4 中比较了脂肪体 cAMP 和 cGMP 水平之间的比率 (表 4)。

自表中可以看到,不论在发育蛹还是滞育蛹中,这两种环核苷酸的比率都保持在一个较稳定的水平。在发育雄蛹中为 $1.9 \pm 0.1:1$, 在滞育雄蛹中为 $4.2 \pm 0.1:1$ 。发育雌蛹中为 $1.1:1$

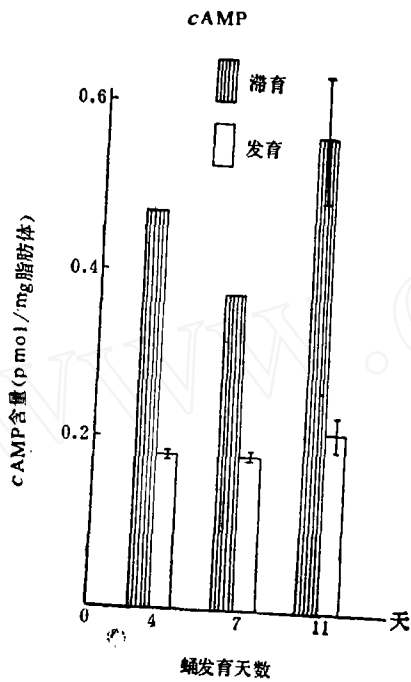


图3 雌蛹脂肪体cAMP水平

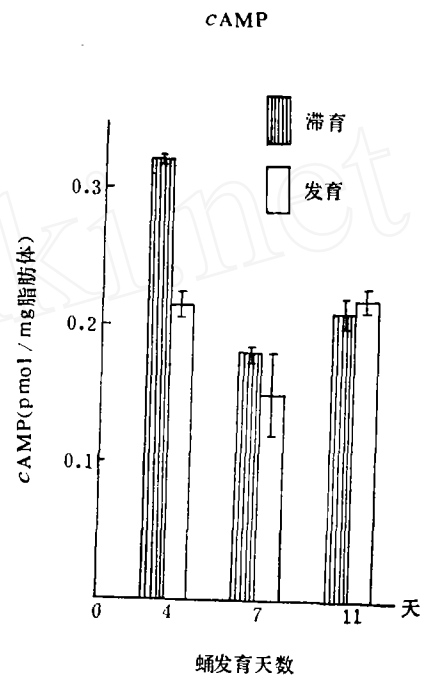


图4 雄蛹脂肪体cAMP水平

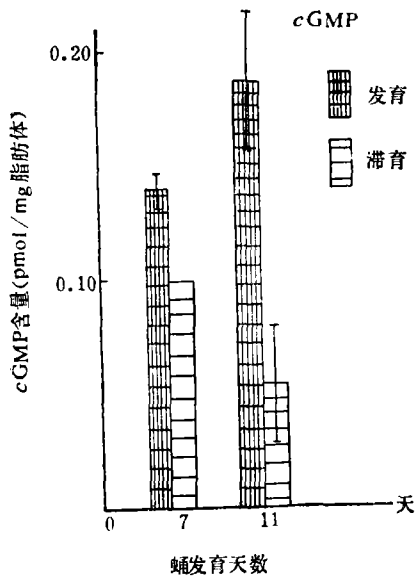


图5 雌蛹脂肪体cGMP水平

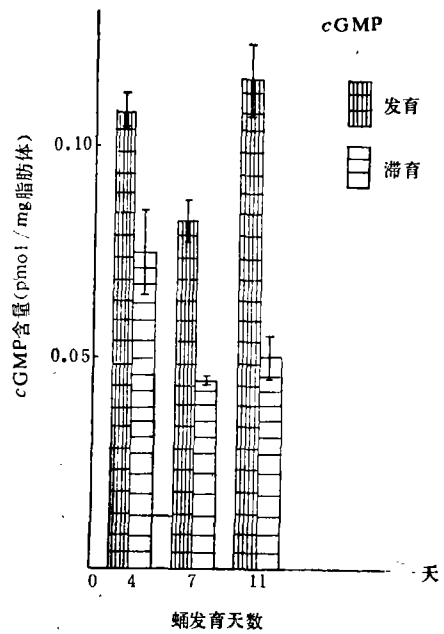


图6 雄蛹脂肪体cGMP水平

—1.3:1, 滞育雌蛹中变化较大,为3.7:1—10.4:1。这两种环核苷酸之间的比率,滞育蛹高于发育蛹。

表 4 棉铃虫蛹脂肪体 cAMP 水平与 cGMP 水平比率比较

时 间	性 别		雄		雌	
	cAMP:cGMP		发 育	滞 育	发 育	滞 育
	第 4 天		2.0:1	4.3:1		
第 7 天		1.8:1	4.1:1	1.3:1	3.7:1	
第 11 天		1.9:1	4.2:1	1.1:1	10.4:1	

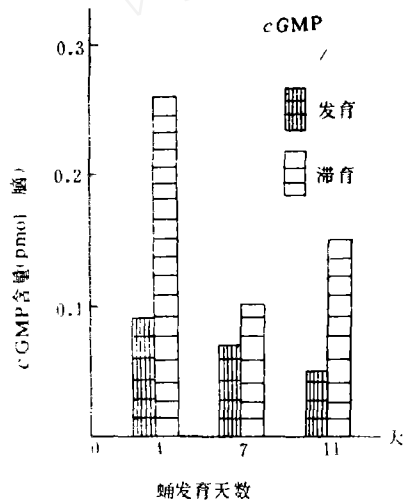


图 7 雄蛹脑的 cGMP 水平

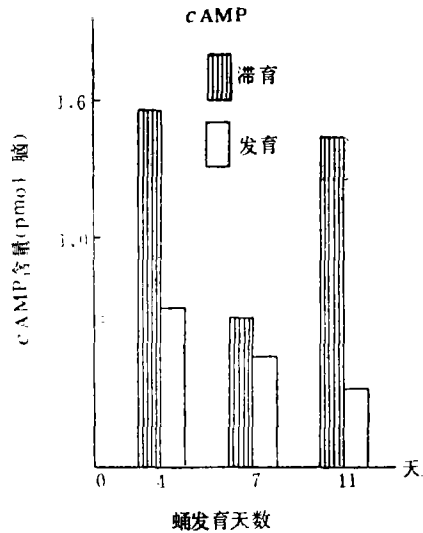


图 8 雄蛹脑的 cAMP 水平

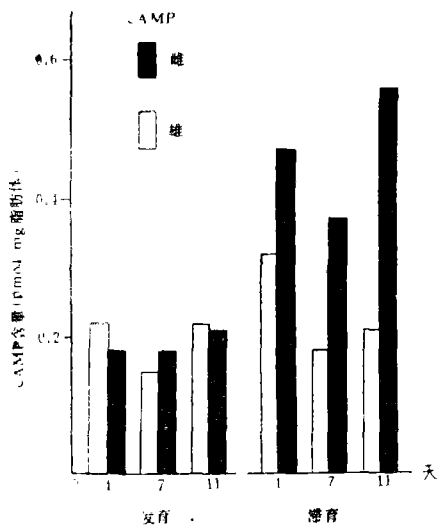


图 9 蛹脂肪体 cAMP 水平雌、雄比较

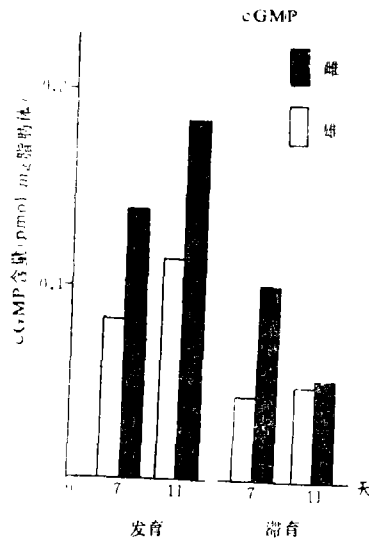


图 10 蛹脂肪体 cGMP 水平雌、雄比较

3. 蛹脑的环核苷酸水平

自结果中可见, 滞育雄蛹脑中的 cAMP 和 cGMP 水平均高于发育蛹。其中第 4 天和第 11 天滞育蛹脑的 cAMP 水平为发育蛹的 2.21 和 4.2 倍, 而 cGMP 水平则将近为发育蛹的 3 倍。这和脂肪体中的情况不尽一致 (见表 2、3 和图 7、8)。

4. 蛹脂肪体环核苷酸水平的雌、雄差异

滞育蛹脂肪体的 cAMP 水平, 雌、雄之间存在较明显的差异。雌蛹高于雄蛹, 为雄蛹的 1.47—2.67 倍。而在发育蛹中, 脂肪体的 cAMP 水平基本上没有雌、雄差异。在发育蛹脂肪体中, cAMP 水平的雌、雄差异始终存在, 雌蛹高于雄蛹, 是雄蛹的 1.6 倍以上。但滞育蛹脂肪体的 cGMP 水平, 在化蛹后第 7 天, 雌蛹为雄蛹的 2.27 倍, 到第 11 天, 雌、雄接近一致。这两种环核苷酸水平之比率, 在发育蛹和滞育蛹中都存在雌、雄差异。在发育蛹中, 雄蛹为 $1.9_{\pm 0.1}:1$, 雌蛹为 $1.1:1-1.3:1$ 。在滞育蛹中, 雄蛹为 $4.2_{\pm 0.3}:1$, 雌蛹为 $3.7:1-10.4:1$ 。

三、讨 论

初步试验结果表明, 光周期的变化确实导致了棉铃虫幼虫体内的环核苷酸水平的变化, 这种变化是迅速的。第一次改变光照后一天, 处理组的环核苷酸水平比对照组高 2.8 (cGMP) — 3.4 (cAMP) 倍, 第二天就下降到低于对照组的水平。由于 cAMP 和 cGMP 都可做为多种神经传递介质的第二信使, 因此, 虫体内 cAMP 和 cGMP 水平的这种变化很可能是在其神经系统传输光照变化信息的过程中产生的。由于前人的大量研究证实, cAMP 或 cGMP 水平升高后, 激活蛋白激酶, 从而可磷酸化多种底物蛋白, 而发挥多种生理作用。例如: 可改变神经细胞膜的电兴奋性; 促进糖元水解和脂代谢, 为神经细胞的功能提供能量; 以及通过磷酸化组蛋白, 解除其对 DNA 信息表达的抑制作用, 调节在神经系统中具特殊功能的蛋白质的合成 (Nathanson 和 Greengard, 1977)。因此, 光照改变后所引起的环核苷酸水平的变化, 可能在棉铃虫感知和贮存光周期变化的信息的过程中具有重要意义。

对蛹脂肪体的环核苷酸水平分析结果表明, 在发育蛹和滞育蛹之间存在差异。一般来说, 滞育蛹的 cAMP 水平高于发育蛹, 而 cGMP 水平低于发育蛹。这两种环核苷酸水平之间的比率, 滞育蛹始终高于发育蛹。前人对细胞生长周期中这两种环核苷酸水平的研究发现, 在细胞的迅速生长和分裂期, cAMP 水平很低而 cGMP 水平很高; 在细胞的静止生长期, cAMP 水平很高而 cGMP 水平很低。高浓度的 cAMP 水平对细胞分裂具抑制作用, 而细胞中 cAMP 水平与 cGMP 水平之间的比率对于细胞的生长和分裂十分重要 (Goldberg 等, 1974)。在滞育的棉铃虫脂肪体中, 代谢率十分低, 细胞的生长, 分裂基本上处于一种抑制状态。其 cAMP 和 cGMP 水平的状况, 正反映了这种状态的生物化学基础。而在滞育蛹脂肪体中, cAMP 水平的雌、雄差异, 则可能由于雌、雄之间的代谢差异所致。在打破滞育过程中, 滞育雌蛹的发育历期要比雄蛹多一天。

在滞育棉铃虫蛹脑中, cAMP 和 cGMP 水平都高于发育蛹, 这与脂肪体中的情况不尽一致。对冷冻的天蚕蛹脑的研究发现 (van der Kloot, 1960), 其脑在冷冻期间累积乙酰胆碱。而乙酰胆碱的累积能导致细胞中 cGMP 水平升高。因为至今尚不明确在棉铃虫滞育蛹脑中是否有乙酰胆碱积累的情况, 所以其 cGMP 水平高的原因尚不清楚。

综上所述,初步的研究结果表明,棉铃虫体内的环核苷酸水平与其滞育的诱导,滞育状态的保持有着密切的关系。由于光周期诱导滞育的生化基础涉及面很广,环核苷酸的作用涉及到细胞代谢调节的多方面,因此,对光周期诱导棉铃虫滞育过程中环核苷酸体系的确切作用,以及由此可能产生的一系列生化反应,尚需进一步研究。

综合前人及本文研究结果,将外界环境因素(光周期和温度)诱导昆虫滞育的可能的生态、生理、生化过程设想如下(图11)。

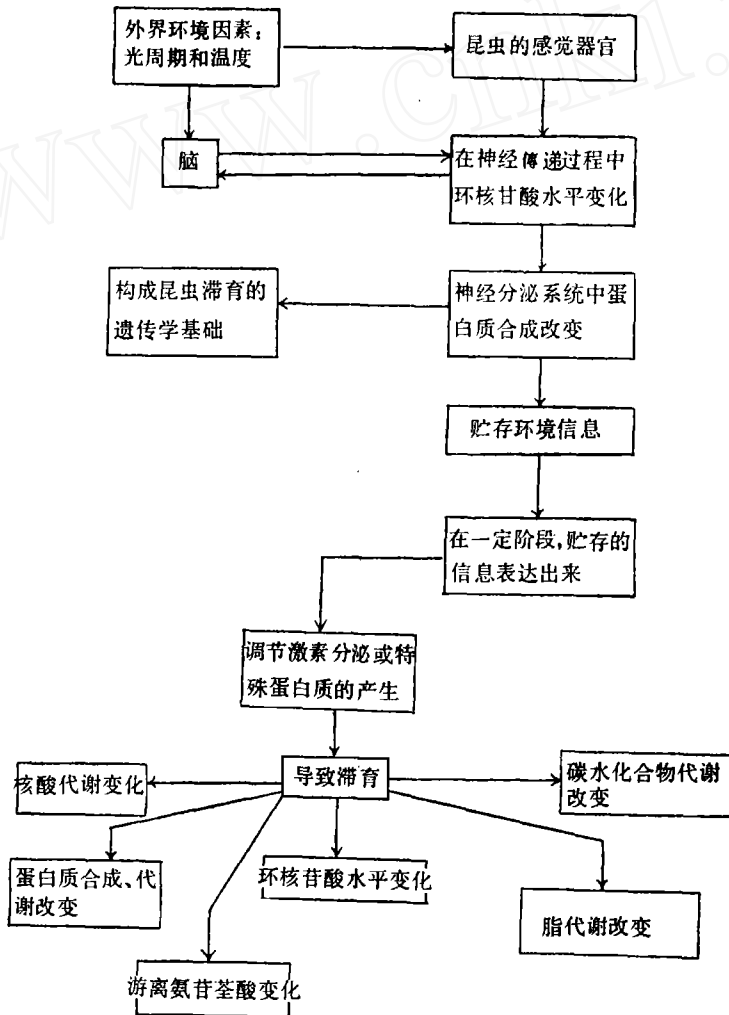


图11 外界环境因素诱导昆虫滞育的可能途径

参 考 文 献

上海第二医学院同位素试验室cGMP放射免疫试剂箱说明书。

李超、谢宝瑜 1981 光周期与温度的联合作用对棉铃虫种群滞育的影响。昆虫知识: 18 (2): 58-61。

刘景生 1980 环一磷酸腺苷(cAMP)的体外放射测定法。免疫化学技术 145-151页,王世中主编,科学出版社。

郭鄂 1979 激素对滞育的调节。昆虫的激素 227-270页。科学出版社。

Achazi, H. K. 1977 The 3':5'-adenosine monophosphate system during the larval--adult moulting cycle in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 7:21-26.

- Beck, S. D. 1980 Insect Photoperiodism. second edition.
- Bodnaryk, R. P. 1979 Identification of specific dopamine and octopamine-sensitive adenylate cyclase in the brain of *Mamestra configurata* WLK. *Insect Biochem.* 9:155—162.
- Bodnaryk, R. P. 1980 Changes in brain octopamine levels during metamorphosis of the moth, *Mamestra configurata* WLK. *Insect Biochem.* 10:169—173.
- Brown, J. J. and G. M. Chippendale 1978. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the south-western corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochem.* 8:359—367.
- Denlinger, D. L. et al. 1978 Cyclic GMP breaks pupal diapause in the fleshfly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 24:715—719.
- Everson, R. D. and D. Feir 1976. Juvenile hormone regulation of cAMP and cAMP phosphodiesterase activity in *Oncopeltus*. *J. Insect Physiol.* 22:781—784.
- Finlayson, L. H. and M. P. Osbone 1977 Effect of cyclic AMP and other compounds on electrical activity of neurohaemal tissue on *Carusius*. *J. Insect Physiol.* 23:429—434.
- Gade, G. 1979 Studies on the influence of synthesis adipokinetic hormone and some analogs on cAMP levels in different arthropod systems. *Gen. Comp. Endocrin.* 37:122—130.
- Gelman, D. B. 1978 Cyclic 3:5-AMP phosphodiesterase activity in corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), and in extracts of brains of the fifth instar. *Comp. Biochem. Physiol.* 61C:249—253.
- Goldberg, N. D. et al 1974 The Yin-Yang Hypothesis of biological control: Opposing influences of cGMP and cAMP in the regulation of cell proliferation and other biological processes. p. 609—626 In Clarkson and Barsera (ed). Control of Proliferation in Animal Cells.
- Hashimoto, E. et al. 1976 Studies on the sites in histones phosphorylation by cAMP-dependent and cGMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 251:6287—6293.
- Leenders, H. J. et al. 1970 Competitive interaction of cAMP on gene activation by ecdysterone. *Exp. Cell Res.* 63:159—164.
- Nathanson, H. A. and P. Greengard 1977 Second Messengers in the Brain. In "Hormones and reproductive behavior". 1979.
- Phillips, J. R. and L. D. Newsom 1966 Diapause in *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Ent. Soc. Amer.* 59:154—159.
- Rasenick, M. M. 1978 Cyclic nucleotides activation of the silkworm brain-cellular localization and further observation on the pattern of activation. *J. Insect Physiol.* 24:137—139.
- Rensing, L. and R. Hardeland 1972 Effects of cAMP on membrane potential, nuclear volume, and puff size in *Drosophila* salivary gland in vitro. *Exp. Cell Res.* 73:311—318.
- Spruill, W. A. et al. 1978 Association of cGMP with gene expression of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4697—4701.
- Taylor, D. P. 1979 The synthesis and control of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the nervous system of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 9:265—276.
- Van der Kloot, W. G. 1960, Neurosecretion in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 5:35—52.

BIOCHEMICAL BASIS OF PHOTOPERIODIC INDUCTION ON DIAPAUSE OF THE COTTON BOLLWORM *HELIOTHIS ARMIGERA* HUBNER

LUO MA GUO FU MA SHIJUN

(*Institute of zoology, Academia Sinica*)

In order to be in quest of the biochemical basis of photoperiodic induction on diapause of the cotton bollworm *Heliothis armigera* Hubner, the present study deals with the following aspects:

1. The levels of the cyclic nucleotides, which have been demonstrated as the second messenger of the polypeptide hormones and the neurotransmitters, in the course of the photoperiodic induction on the diapause of the bollworm *Heliothis armigera* Hubner were studied.

2. The levels of the cyclic nucleotides in the brain and the fat body of the diapausing pupae were determined.

The results obtained are as follows:

1. One day after the first time of changing the photoperiod the cAMP level of the whole body of the bollworm larvae was increased by 3.4 times, and the cGMP level was increased by 2.8 times. These facts show that the changes in the levels of the cyclic nucleotides do response to the photoperiodic induction.

2. The cGMP level in the fat body of the diapausing pupae is lower than that of the developing pupae, and the cAMP level is higher than that of the developing ones. Both the cAMP level and the cGMP level in the brain of the diapausing pupae are higher than that of the developing ones. The ratio between the cAMP level and the cGMP level in the fat body of the diapausing pupae is kept constantly higher than that of the non-diapausing pupae, and it is kept on a stable level in the fat body of both the diapausing pupae and the developing ones.

3. There are differences between male and female in the cGMP level of the developing pupae as well as in the cAMP level of the diapausing ones.

The possible role of the cyclic nucleotides in the course of the photoperiodic induction on the diapause, and on the diapause maintenance of the insect is discussed.