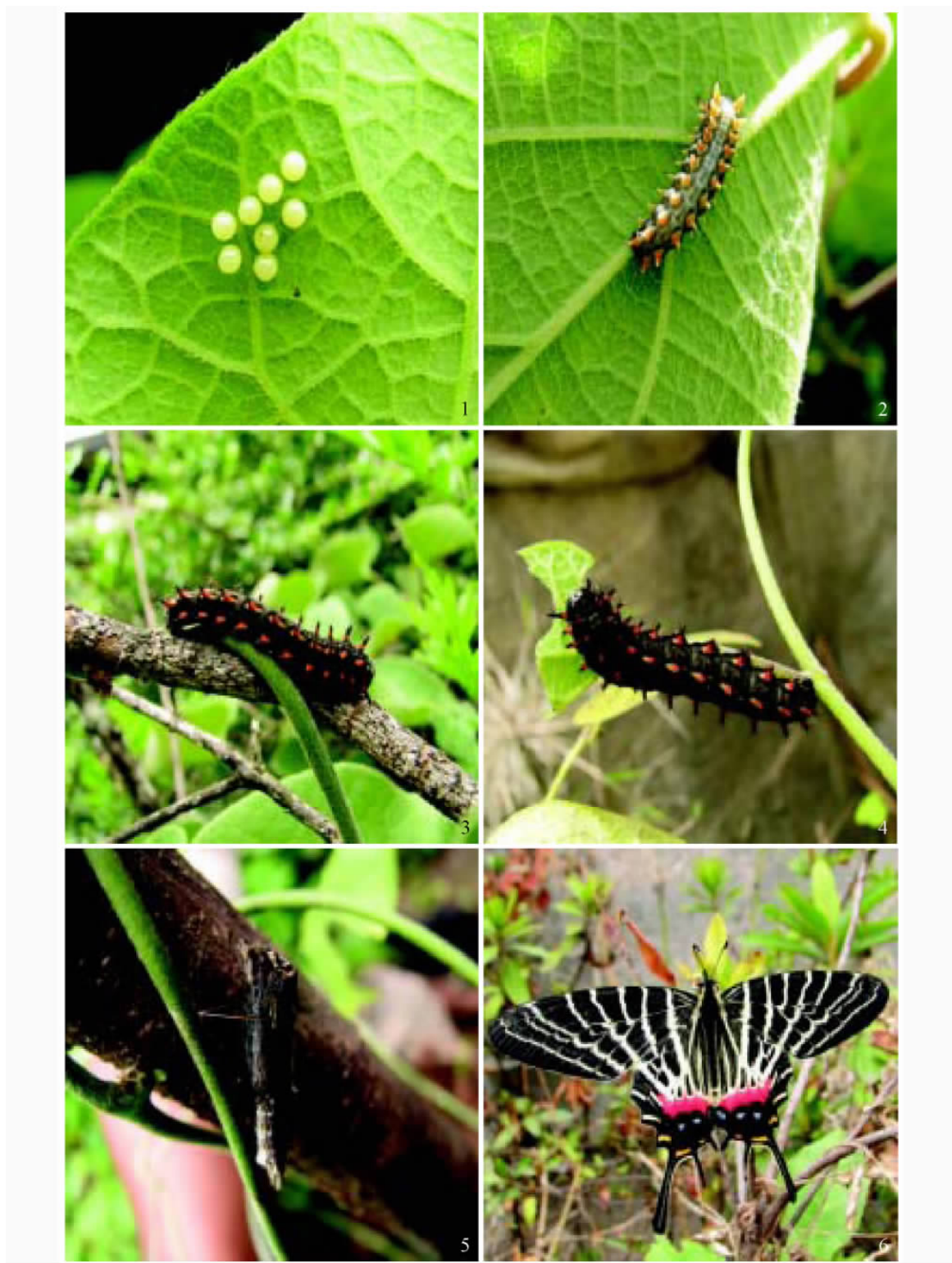


图版 I 玉龙尾凤蝶的形态

Plate I Morphological of *Bhutanitis yulongensis*1. 卵 Egg; 2. 3 龄幼虫 3rd instars; 3. 4 龄幼虫 4th instar; 4. 5 龄幼虫 5th instar; 5. 蛹 Pupae; 6. 成虫 Adult.

灰翅麦茎蜂蛹的发育分级研究

陈阿兰* 陈海龙

(青海大学农牧学院 西宁 810016)

摘 要 室内饲养了灰翅麦茎蜂 *Cephus fumipennis* Eversmann, 对该种蛹的发育进行了研究。结果表明, 灰翅麦茎蜂蛹期 (30 ± 2.08) d, 根据蛹体色的显著变化分为 5 级 (I, II, III, IV, V), 其历期依次为: (6.5 ± 0.55) d、(3.9 ± 0.48) d、(4.4 ± 0.5) d、(4.6 ± 0.49) d 和 (10.5 ± 1.04) d。通过蛹的发育进度和分级预测法研究, 可预测灰翅麦茎蜂成虫的防治适期。

关键词 灰翅麦茎蜂, 蛹, 分级预测法

Study on the developmental grades of pupa of *Cephus fumipennis* Eversmann

CHEN A-Lan* CHEN Hai-Long

(Agriculture and Animal Husbandry College of Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract Observation of the development of laboratory-bred pupae of *Cephus fumipennis* Eversmann indicates that the pupal period lasts (30 ± 2.08) d and can be divided into 5 stages (I, II, III, IV, V) according to the color of a pupa's body. These stages last (6.5 ± 0.55) d, (3.9 ± 0.48) d, (4.4 ± 0.5) d, (4.6 ± 0.49) d and (10.5 ± 1.04) d respectively. Based on these observations, the optimal time to control adult *C. fumipennis* can be predicted.

Key words *Cephus fumipennis*, pupa, grades predicted method

灰翅麦茎蜂 *Cephus fumipennis* Eversmann 是青海省春小麦主要蛀茎害虫之一(黄相国等, 2003)。小麦被蛀率一般为 10% ~ 20%, 严重地区高达 30% ~ 50%。以幼虫危害小麦茎秆内壁, 影响茎内养分及水分的传导, 造成春小麦的白穗、子粒瘪瘪, 千粒重下降, 严重影响春小麦的产量和质量(徐培河, 1989)。目前青海省以防治成虫作为其主要防治措施, 但该虫从小麦孕穗初到抽穗后成虫陆续羽化, 持续时间较长, 其产卵期长达 30 多天。因此把大量成虫消灭在产卵蛀茎之前是防治的关键(强中发等, 1998)。防治过早或过晚均达不到最大限度地消灭成虫、减轻为害的目的(吕和平等, 1996)。如何选择防治适期是生产上急待解决的问题。有关利用灰翅麦茎蜂蛹的发育进度预测成虫发生期的研究目前尚未见报道, 本文对灰翅麦茎蜂蛹的发育进度进行了详细研究, 为灰翅麦茎蜂成虫预测预报和防治适期的确定提供了科

学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

灰翅麦茎蜂以老熟幼虫在小麦根茬内越冬。分批采集有灰翅麦茎蜂越冬虫的小麦根茬在养虫盒中饲养观察。

1.2 蛹的发育观察

将同一天化蛹的虫茬(露出虫茧但茧壳不能破损)分组编号, 放入养虫盒内保湿饲养。

每日上、下午各观察 1 次, 详细记录蛹体的形态变化。

1.3 田间观察

2008 年 4 月下旬开始, 每 5 d 1 次从田间随机采回 50 头以上虫茬, 剥查蛹的发育进度, 进行分级统计; 从 5 月中旬开始在田间网捕成虫, 每 2 d 1 次, 每次 100 复网, 重复 5 次, 分别统计雌雄个体

* E-mail: cal-6507@163.com

收稿日期: 2010-12-06, 接受日期: 2011-02-11

数。

2 结果与分析

2.1 蛹的发育过程

灰翅麦茎蜂的蛹为裸蛹。蛹体长 10 ~ 12 mm, 头宽 1.10 ~ 1.50 mm。初化蛹的蛹体为半透明乳黄色。首先变化的是复眼由乳黄色逐渐加深变为浅红褐色、红褐色、褐色最终为黑色。接下来是头部由乳黄色逐渐加深变为浅红褐色、红褐色、褐色最终为黑色。头部变黑后胸部依此由前胸, 中胸, 后胸由乳黄色逐渐加深变为浅红褐色、红褐色、褐色最终为黑色。胸部变黑后腹部由第一节到最后一节逐渐颜色加深, 触角变黑, 后足跗节和爪变黑。腹节处和腹侧出现黄色条带, 腹部第一节有 1 个三角形的黄绿色的凹斑。后期头部黑色, 触角黑色, 腹部黑色, 前足和中足的胫节黑色, 其端部, 跗节黄色。

雌雄蛹的形态特征分化出现在后期, 雄性腹部背面有 2 条黄色环带。雌性腹部两侧有 2 条黄

色纵带。化蛹结束后新羽化的成虫将茧壳咬破 1 个口脱茧而出, 时间为 15 min。羽化口在靠近茧的上部。蛹的历期为 (30 ± 2.08) d。

2.2 蛹级的划分

灰翅麦茎蜂蛹的历期为 30 d 左右, 较长, 颜色变化明显, 根据其变化特点, 可将蛹期划分为 5 级 (图 1: a ~ e)。

I 级: 蛹为乳黄色半透明, 复眼由乳黄色变为黑色, 历期为 (6.5 ± 0.55) d。

II 级: 蛹体头部由乳黄色变为黑色, 历期为 (3.9 ± 0.48) d。

III 级: 蛹体胸部从前胸、中胸、后胸开始, 由乳黄色变为黑色, 历期为 (4.4 ± 0.50) d。

IV 级: 蛹体腹部从前到后, 由乳黄色变为黑色, 历期为 (4.6 ± 0.49) d。

V 级: 蛹体黑色直至羽化, 历期为 (10.5 ± 1.04) d。

蛹发育至 V 级, 雌雄蛹形态分化, 雌虫腹部较肥大, 腹侧有 2 条黄色纵带, 腹部末节有一带毛的

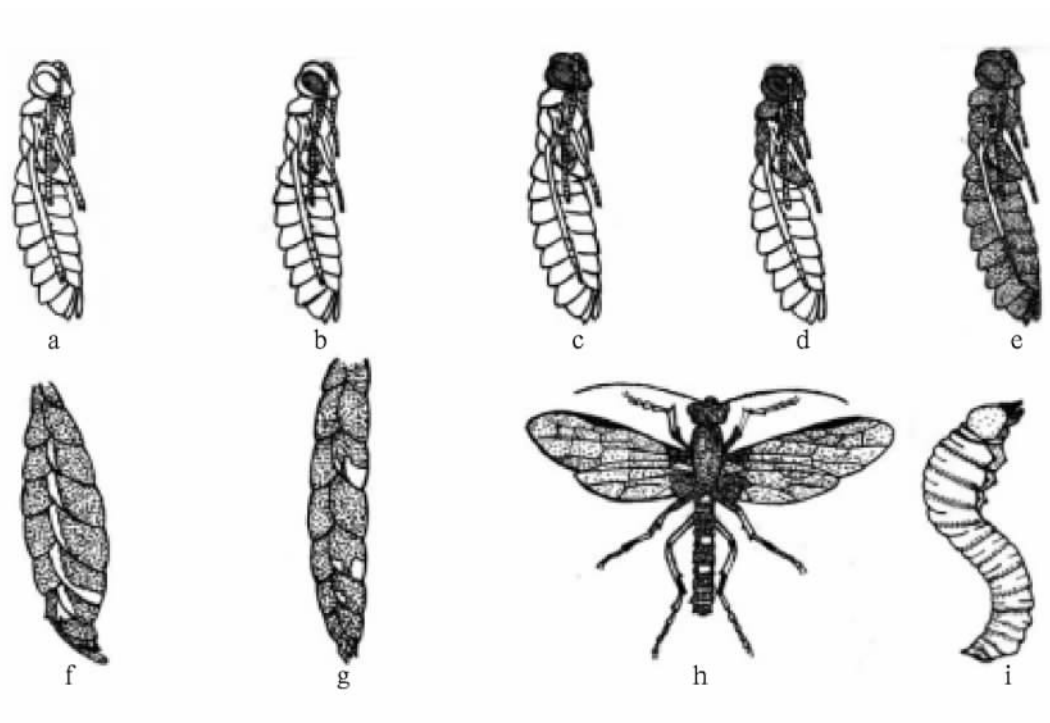


图 1 灰翅麦茎蜂形态图

Fig. 1 The morphological of *Cephus fumipennis*

a. I 级蛹 The first stage of pupa; b. II 级蛹 The second stage of pupa; c. III 级蛹 The third stage of pupa; d. IV 级蛹 The forth stage of pupa; e. V 级蛹 The fifth stage of pupa; f. 雌蛹腹部 Abdominal part of femineus pupa; g. 雄蛹腹部 Abdominal part of male pupa; h. 成虫 Adult; i. 越冬幼虫 Hibernating larve.

产卵器鞘,内有一红褐色的端部具有锯齿状产卵器(图 1:f);雄虫腹部较窄较长,腹背部有 2 条黄色环带(图 1:g)。雌雄蛹的历期不同,雄蛹历期为 (9.7 ± 0.85) d,雌蛹历期为 (11.1 ± 0.72) d。

2.3 蛹的分级预测法

灰翅麦茎蜂蛹的历期较长,在西宁 4 月下旬开始化蛹,根据各级蛹的历期,于 2008 年 4 月下旬开始在田间作系统发育进度的检查(表 1),以 16%、50% 和 84% 为始盛期、高峰期和盛末期标准,根据蛹的分级预测法,预测成虫始见期、始盛期和高峰期。

如表 1 所示,4 月 22 日灰翅麦茎蜂已有化蛹,则羽化始见期为:4 月 22 日 + 各级蛹的历期 29.9 d(6.5 d + 3.9 d + 4.4 d + 4.6 d + 10.5 d) = 5 月 22 日,实际的羽化始见期为 5 月 24 日。

5 月 2 日,从蛹壳累加至第 I 级蛹的百分率已达 26.6%,蛹已进入始盛期,则羽化始盛期:4 月 27 日 + 3.3 d(I 级蛹历期的一半) + 23.4 d(II ~ V 级蛹的历期) = 5 月 29 日。

5 月 7 日,从蛹壳累加至第 I 级蛹的百分率已

达 71.2%,蛹已进入高峰期,则羽化高峰期:5 月 7 日 + 3.3 d(I 级蛹历期的一半) + 23.4 d(II ~ V 级蛹的历期) = 6 月 3 日。

5 月 12 日,从蛹壳累加至第 II 级蛹的百分率已达 53.4%,则羽化高峰期:5 月 12 日 + 2 d(II 级蛹历期的一半) + 19.5 d(III ~ V 级蛹的历期) = 6 月 2 日—6 月 3 日。

5 月 22 日,从蛹壳累加至第 III 级蛹的百分率已达 61.6%,则羽化高峰期:5 月 22 日 + 2.2 d(III 级蛹历期的一半) + 15.1 d(IV ~ V 级蛹的历期) = 6 月 8 日。

5 月 27 日,从蛹壳累加至第 III 级蛹的百分率达 53.9%,则羽化高峰期:5 月 27 日 + 2.2 d(III 级蛹历期的一半) + 15.1 d(IV ~ V 级蛹的历期) = 6 月 13 日—6 月 14 日。

6 月 3 日,从蛹壳累加至第 IV 级蛹的百分率达 59.8%,则羽化高峰期:6 月 3 日 + 2.3 d(IV 级蛹历期的一半) + 10.5 d(V 级蛹的历期) = 6 月 16 日。

表 1 西宁地区灰翅麦茎蜂蛹的发育进度分级调查表

Table 1 Survey table on the developmental grades of pupa of *Cephus fumipennis* (Xining)

调查日期 (日/月) Survey date (day/month)	活虫数 Numbers of living insect	幼虫率 (%) Larvae rate(%)	各级蛹百分率(%) Different pupa rate(%)					羽化率 (%) Emergence rate(%)
			1	2	3	4	5	
17/4	84	100						
22/4	95	94.3	5.7					
2/5	110	73.4	25.0	1.6				
7/5	93	28.8	34.9	27.0	7.0	2.3		
12/5	115	19.9	26.7	30.0	16.7	5.0	1.7	
22/5	120	11.0	12.9	14.5	21.0	22.6	16.0	2.0
27/5	96	13.0	9.1	14.0	19.0	18.7	15.4	10.8
3/6	98	10.1	7.2	10.3	12.6	12.9	19.4	27.5

2.4 田间验证

2008 年 5 月中旬开始在田间网捕成虫(图 1:h),每 2 d 1 次,统计结果见图 2。灰翅麦茎蜂成虫田间消长调查表明,成虫实际发生的始见期为 5 月 24 日,预测的为 5 月 22 日,推迟了 2 d;成虫实际发生的高峰期 6 月 5 日至 6 月 17 日,持续半月左右,预测的为 6 月 3 日至 6 月 16 日,与实际发生的高峰期基本一致。

3 讨论

3.1 灰翅麦茎蜂的卵、幼虫、蛹均在小麦茎腔内和根茬内生活,只有成虫在小麦茎秆外活动。所以,成虫期是最理想的药剂防治时期。通过田间剥茬调查及成虫网捕调查,灰翅麦茎蜂在西宁地区成虫羽化出茧持续时间长,需 40 d 左右,成虫出茧的整齐度较差,掌握成虫羽化出茧规律对于成

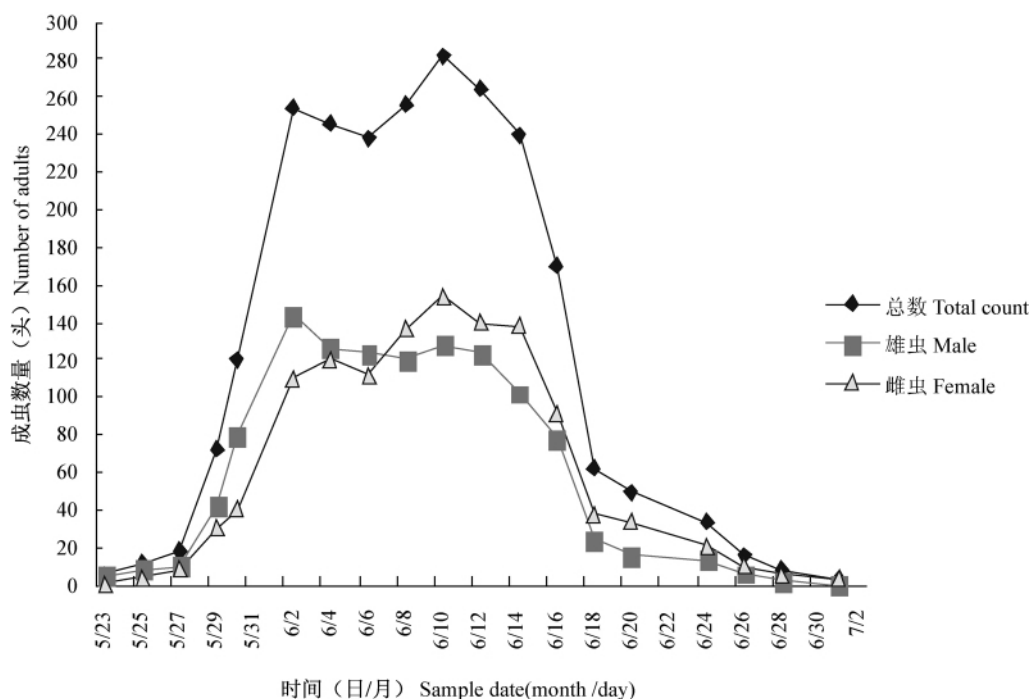


图2 2008年灰翅麦茎蜂成虫田间发生数量

Fig. 2 Number of adults of *Cephus fumipennis* in field in 2008

虫期施药防治非常关键。灰翅麦茎蜂在青海省连年发生,各地一般在初见羽化成虫或羽化率达5%~8%时组织人力物力开展防治,其结果并不理想,其原因是防治偏早,过早喷药还会造成浪费(强中发等,1998)。因灰翅麦茎蜂越冬幼虫和蛹的历期长,所以采用分龄分级预测法较为方便;每年通过剥荏,检查越冬幼虫(图1:i)化蛹以及蛹的发育级数,预测成虫的始见期、始盛期和高峰期(张孝曦,2002),可显著提高防治效果,在生产实践中具有重要的指导意义。

3.2 西宁春季经常出现倒春寒,每年春季气候的变化较大,这也导致灰翅麦茎蜂成虫发生期在每年都有所不同,如果不根据每年春季温度变化进行预测预报,很难准确掌握成虫的防治适期。灰翅麦茎蜂蛹的发育分级特征比较明显,容易掌握。应用在测报上,只要按通常的抽样技术,在初见成虫时,每年5月中旬到下旬对主要类型田进行2~

3次蛹的分级调查,就可预测当年麦茎蜂成虫羽化的始盛期和高峰期,即可确定防治适期。这种蛹的发育分级调查法,具有较省时、省力、准确等优点,尤其对春季气候变化较大的地区,每年通过此法预测成虫羽化的时间,就更为准确。

参考文献(References)

- 黄相国,王海庆,葛菊梅,郅和臣,李春喜,2003. 灰翅麦茎蜂的生物学及其防治对策. 昆虫知识,40(6):515—516.
- 吕和平,罗进仓,陈明,1996. 灰翅麦茎蜂为害损失结构分析及防治指标研究. 昆虫知识,33(6):327—329.
- 强中发,侯生英,张贵,王爱玲,1998. 灰翅麦茎蜂防治适期研究. 青海农林科技,3:3—49.
- 徐培河,1989. 农田有害生物的防除. 西宁:青海人民出版社. 3—4.
- 张孝曦,2002. 昆虫生态及预测预报(第三版). 北京:中国农业出版社. 212—214.



利用正交法确定测定意大利蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性最佳反应条件^{*}

唐晓伟^{1,2**} 高希武² 刁青云^{1***}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 荧光分光光度法检测意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinol 细胞色素 P450 O-脱乙基活性方便快捷、较灵敏,以 7-乙氧基香豆素为底物,通过测定其产物 7-羟基香豆素的荧光变化来确定细胞色素 P450 O-脱乙基的活性。在利用荧光分光光度法检测意大利蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性过程中,反应体系 pH 值、反应时间、反应温度对实验结果影响较大,本实验在确定最佳底物终浓度和辅酶 NADPH 终浓度的前提下用正交法研究了 pH 值、反应时间、反应温度 3 个因素对意大利蜜蜂细胞色素 P450 O-脱乙基活性的影响。极差分析和方差分析表明,3 个因素对实验结果影响大小顺序为:时间 > 温度 > pH 值,并且得到最佳组合条件为:反应时间 20 min、温度 40℃ 及 pH 值 7.8。

关键词 意大利蜜蜂, 细胞色素 P450 O-脱乙基活性, 正交试验, 荧光分光光度法, 最佳条件

The optimum conditions for assaying 7-ethoxycoumarin O-deethoxylation of cytochrome P450 from the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spinol) by orthogonal matrix method

TANG Xiao-Wei^{1,2**} GAO Xi-Wu² DIAO Qing-Yun^{1***}

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;

2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The 7-ethoxycoumarin O-deethoxylation (ECOD) activity of cytochrome P450 (CytP450) was determined using fluorescence spectrophotometry with 7-ethoxycoumarin as a substrate. This method was sensitive and convenient. The optimal conditions for assaying the ECOD activity of cytochrome P450 (CytP450) in *Apis mellifera ligustica* Spinol were determined using the orthogonal matrix method. The results show that reaction time was the most important factor determining the ECOD activity of CytP450 in honeybees. The relative importance of time, temperature and pH on the ECOD activity of CytP450 were, in descending order, time > temperature > pH. The optimal conditions were pH of 7.8, reaction temperature of 40℃ and reaction time of 20 minutes.

Key words *Apis mellifera ligustica*, O-deethoxylation, cytochrome P450 monooxygenase, orthogonal experiment, fluorescence spectrophotometry, optimal conditions

多功能氧化酶(MFO)是生物体内脂肪酸、生物碱、激素等内源性化合物以及药物、植物毒素、

杀虫药剂等外源性化合物的重要氧化代谢系统(冷欣夫和邱星辉,2001)。细胞色素 P450 酶系

* 资助项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAD06B04)。

** E-mail: txw7880540@163.com

*** 通讯作者, E-mail: dqyun1@126.com

收稿日期: 2010-12-28, 接受日期: 2011-05-30

(CytP450) 是多功能氧化酶系统中的末端氧化酶, 位于光滑内质网膜上, 具有活化氧分子和与底物结合的双重功能 (Stegeman and Livingstone, 1998)。

CytP450 能够通过对农药氧化代谢能力的增强引起害虫的抗药性。昆虫体内 CytP450 含量的变化常常作为衡量害虫抗药性的指标之一 (Scott, 1999)。此外, CytP450 参与对昆虫激素 (包括蜕皮激素与保幼激素等) 的合成与分解, 对植物毒素以及杀虫剂等化合物起解毒或活化作用 (Schuler, 1996)。因此, CytP450 在许多代谢途径中作为重要酶系而存在。截至目前, 常采用以下 4 种模式底物进行 CytP450 活性测定: 一是对硝基苯甲醚氧脱甲基活力 (PNOD) 测定, 利用其产物对硝基苯酚 (PNP) 碱性条件下在 412 nm 有吸收峰的特点, 用分光光度计检测 (Hansen and Hodgson, 1971) 或用高效液相色谱法检测 (艾国民等, 2009)。二是甲基试卤灵氧脱甲基活力 (MROD) 测定, 主要参照 Mayer 等 (1977) 的方法, 以甲氧试卤灵为底物, 通过测定其产物试卤灵的荧光变化确定酶的活性。三是 7-乙氧基香豆素脱乙基活力 (ECOD) 测定, 利用荧光分光光度计检测产物 7-羟基香豆素的荧光变化确定酶的活性 (Aitio, 1978)。四是艾氏剂环氧化活力 (AE) 测定, 利用气相色谱法检测艾氏剂在细胞色素 P450 环氧化作用下生成的狄氏剂的量来测定细胞色素 P450 的活性 (Wolff *et al.*, 1979)。

蜜蜂是一种具有较高经济效益、生态效益和广泛社会效益的经济动物, 由于从事采集活动需要经常暴露在有害外源物质环境中。近年来蜜蜂中毒事件时有发生, 因此有必要对蜜蜂体内重要的解毒酶系——细胞色素 P450 酶系进行研究, 以便为蜜蜂保护提供指导。在 20 世纪 80 年代, 国外对蜜蜂体内包括多功能氧化酶在内的解毒酶有过一些研究 (Smirle *et al.*, 1984; Yu *et al.*, 1984; Smirle and Winston, 1987; Kezić *et al.*, 1992), 采用的测定方法是艾氏剂环氧化酶活力测定法。早在 20 世纪 60 年代就已证明 P450s 具有催化环戊二烯杀虫剂的环氧化作用, 艾氏剂变成狄氏剂已经作为 P450 酶系催化的一种模式反应, 研究比较广泛和深入, 而且经常采用气相色谱法对产物进行检测 (Yao *et al.*, 1988; 邱立红等, 1999)。采用这种方法时, 虽然产物狄氏剂很稳定, 而且样品用量

少、灵敏度也较高, 但是也有一些缺点。首先, 艾氏剂和狄氏剂都是剧毒的药品, 操作过程中具有一定危害性。另外, 利用气相色谱法在对组分直接进行定性分析时, 必须用已知物或已知数据与相应的色谱峰进行对比, 或与其他方法 (如质谱、光谱) 联用, 才能获得直接肯定的结果, 而且操作比较繁琐, 不适合大量样品测定。国内对蜜蜂多功能氧化酶的研究还未见报道, 与其它昆虫在多功能氧化酶方面研究的进展和深度相比, 蜜蜂多功能氧化酶的研究还有许多待解决的问题。本研究采用了方便快捷、较灵敏的 7-乙氧基香豆素脱乙基活力 (ECOD) 测定法, 通过正交试验确定蜜蜂幼虫细胞色素 P450 O-脱乙基活性的最佳测定条件, 为今后蜜蜂多功能氧化酶的深入了解做必要的基础性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试蜜蜂 意大利蜜蜂幼虫采自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂育种研究室。所有供试幼虫均为 6 龄幼虫。

1.1.2 试剂 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自德国 Merck 公司, 含量大于 99%; 二硫代苏糖醇 (DTT) 含量大于 99%、还原型辅酶 II 四钠盐 (NADPH) 含量大于 99% 均为 Biomol 公司产品; Tris 碱为美国 Promega 公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA) 自北京同正生物公司; 考马斯亮蓝 G250、7-羟基香豆素 (7-Hydroxycoumarin)、7-乙氧基香豆素 (7-Ethoxycoumarin) 均为 Sigma 公司产品; 甘油、盐酸、氯化钾和氢氧化钠、甘氨酸 (Gly)、三氯乙酸 (TCA)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 均为分析纯, 系北京化学试剂公司产品。

1.1.3 主要仪器 5417R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司产品)、SPH-400B 型恒温振荡器 (上海世平实验设备公司产品)、LS55 型荧光分光光度计 (英国 Perkin Elmer 公司产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 酶液的制备 参考于彩虹和高希武 (2005) 的方法: 于蜂脾内取标记好 6 龄期封盖幼虫, 直接用于实验或者 -80℃ 保存。在 5 头蜜蜂幼虫中加入 2 mL 的 0.1 mol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L PMSF, 50