

二个不同发育阶段茶银尺蠖雌蛾性腺超微结构的比较研究^{*}

胡文静¹ 陈文龙^{1**} 韦 卫²

(1. 贵州大学昆虫研究所 贵州山地农业病虫害重点实验室 贵阳 550025;

2. 中国科学院动物研究所 北京 100101)

摘 要 本文利用扫描电镜和透射电镜分别对不同发育阶段的茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria* Herrich-Schaeffer 雌蛾性信息素腺体进行了观察和研究,对探索信息素的合成途径提供科学依据。结果表明,雌蛾性信息素腺体位于第8、9/10腹节的节间膜上,由其表皮下方的单层上皮细胞组成,并几乎覆盖整个节间膜形成一个近乎完整的环状。成熟雌蛾(3日龄)性腺的超微结构照片显示性腺细胞具有发达的微绒毛、质膜内褶、大量的脂滴、细胞间的运输孔道以及细胞桥粒等结构组织。而在未成熟雌蛾(羽化5h内)性腺细胞内,这些结构均明显缺失或发育不完整。

关键词 茶银尺蠖, 性信息素腺体, 超微结构, 扫描电镜, 透射电镜

Comparative studies on ultrastructure of sex pheromone gland in female *Scopula subpunctaria* at different developmental stages

HU Wen-Jing¹ CHEN Wen-Long^{1**} WEI Wei²

(1. Key Laboratory of Plant Disease and Pest Management for Mountain Agriculture in Guizhou Province,

Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Different developmental stages of the sex pheromone gland of female *Scopula subpunctaria* Herrich-Schaeffer were observed using SEM (scanning electron microscope) and TEM (transmission electron microscopy). The results show that the pheromone gland is formed by hypertrophied epidermal cells which occupy an almost complete ring at the intersegmental membrane between abdominal segments 8 and 9/10. Ultrastructure of the pheromone gland cells of mature (3 day old) female moths revealed distinct features, such as well-developed microvilli, plasma membrane infoldings, abundant lipid droplets, intercellular canals and desmosomes. Conversely, the pheromone gland cells of immature (within 5 h after eclosion) female moths are smaller in size, the microvilli and plasma membrane infoldings are poorly developed and the cytoplasm contains fewer intercellular canals and no lipid droplets.

Key words *Scopula subpunctaria*, sex pheromone gland, ultrastructure, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy

茶银尺蠖 *Scopula subpunctaria* Herrich-Schaeffer 属鳞翅目 (Lepidoptera), 尺蛾科 (Geometridae), 是茶树主要害虫之一, 以幼虫咀嚼叶片为害, 可将叶片全部食光, 仅留主脉。因其繁

殖快, 发生代数多, 蔓延迅速, 很容易暴发成灾, 一年中以春、秋两季为害最为严重 (丁锦华等, 1980)。其危害范围已涉及到江苏、浙江、安徽、湖南、贵州等地, 已给我国南方各省的茶业发展造成

^{*} 资助项目: 贵州省科技厅农业攻关项目茶树重要病虫害无公害防治技术与推广 (黔科合字 NY 字 [2010] 3024)、国家 973 项目 (071J532433)、中国烟草总公司贵州省公司科技项目 (200901)。

^{**} 通讯作者, E-mail: CWL001@163.com

收稿日期: 2010-11-22, 接受日期: 2011-01-17

相当严重的损失。目前,对其防治的主要手段仍然是化学防治,由于长期大量使用化学农药,不仅导致有益天敌减少、生态环境破坏、害虫的抗药性增强,更使茶产品因农残超标给人体造成极大伤害,但目前仍缺乏有效的生物防治手段。因此,进行无公害茶叶生产,使用其它无公害综合防治手段控制害虫势在必行。目前,人工合成性信息素作为一种简便、高效、无毒、不伤害益虫、不污染环境的害虫综合防治措施之一,已被国内外广泛应用(Howes *et al.*, 1998; 赵连吉等, 2003),因此,利用此方法来防治茶银尺蠖是十分必要可行的。

鳞翅目雌性性信息素腺体是分泌性信息素的重要器官,普遍认为其位置位于第8和第9/10腹节中间的节间膜(Percy and MacDonald, 1987),但也有研究发现其位置不仅限于此,如夜蛾科的蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 的性腺是位于第7和第8腹节的节间膜(Sreng and Sreng, 1988);而菜蛾科的小菜蛾 *Plutella xylostella* 性腺则不仅存在于第8和第9/10节间膜,还包括第9/10节背部内层增厚的表皮细胞和交配囊孔周围的上皮细胞(Chow, 1976)。明确性信息素腺体细胞的所在位置是快速、准确提取雌蛾性信息素的基础,而对于信息素产生和释放机理的探明是人工合理设计、合成和高效利用性诱剂的前提。

因此,本研究采用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)分别对不同发育状态下茶银尺蠖雌蛾腹尖的整体形态和性腺细胞的超微结构进行了细致的观察。意在探明其腺体所在位置,为信息素准确、高效、快速的提取做准备。并针对发育不同阶段中差异显著的细胞结构进行详尽的形态描述和功能分析。从而为明确信息素生物合成途径以及其化学通讯机制做好铺垫。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

茶银尺蠖幼虫采于贵阳市花溪马场茶场,用新鲜茶叶作为饲料,在多段编程人工气候箱(宁波江南仪器厂制造)内饲养2代以上。气候箱温度设置为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照周期 L:D = 14:10,相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 。蛹期将雌雄蛹分置,成虫羽化后依日龄分别装入不同笼内饲养,期间每日喂以

10% 蜂蜜水。

1.2 样品制备

实验发现,茶银尺蠖雌蛾最早在羽化次日晚交配,因此,分别选取3日龄雌蛾和羽化5h内雌蛾作为成熟与未成熟雌蛾性腺细胞观察的透镜实验材料。依实验需要取不同日龄处女蛾后,轻轻挤压其腹部,使第8和第9/10腹节节间膜外翻,产卵瓣完全露出。用手术刀迅速在第7腹节处切下后投入5%戊二醛固定。

1.3 扫描电镜观察

用5%戊二醛固定3h后,pH为7.2的磷酸缓冲液洗涤数次,乙醇梯度脱水(依次用50%、60%、70%、80%、90%乙醇脱水各10min,100%乙醇脱水10min×2次),临界点干燥,喷金,日立S-3400N扫描电镜观察。

1.4 透射电镜观察

用5%戊二醛溶液中固定3h后,pH为7.2二甲砷酸钠缓冲溶液洗涤数次,1%的锇酸溶液固定2h,再用二甲砷酸钠缓冲液洗涤数次,丙酮梯度脱水(依次用50%、60%、70%、80%、90%丙酮脱水各10min,100%丙酮脱水10min×2次),经包埋、切片、染色后,最后用日立H-7650透射电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 性信息素腺体的位置和外部形态

雌蛾在静息时,第8、9/10腹节和其之间的节间膜一起套缩在第7腹节内。自然状态下当雌蛾进入呼唤状态时,腹部背面与水平面约成 90° 上翘,节间褶外翻呈乳白色,尖端向外伸出,露出末端产卵器。经扫描电镜进一步观察,性腺细胞位于第8、9/10腹节间的节间膜上,由其表皮下方的上皮细胞(epithelial cells)组成。第8腹节为环状,由于起保护作用已重度骨化,其后方末端有鳞片附着。第9/10腹节末端特化成产卵器,着生有长短不一的刚毛,而其间的节间膜无刚毛、鳞片等附着物(图1:A)。性腺细胞整体外形呈现凸起的长圆丘状或基部膨大的长刺状,密布于8、9/10腹节间的节间膜上(图1:B,C)。前者位于靠近第8腹节处,后者较前者多,位于节间膜中间和靠近第9/10腹节处(图1:D)。

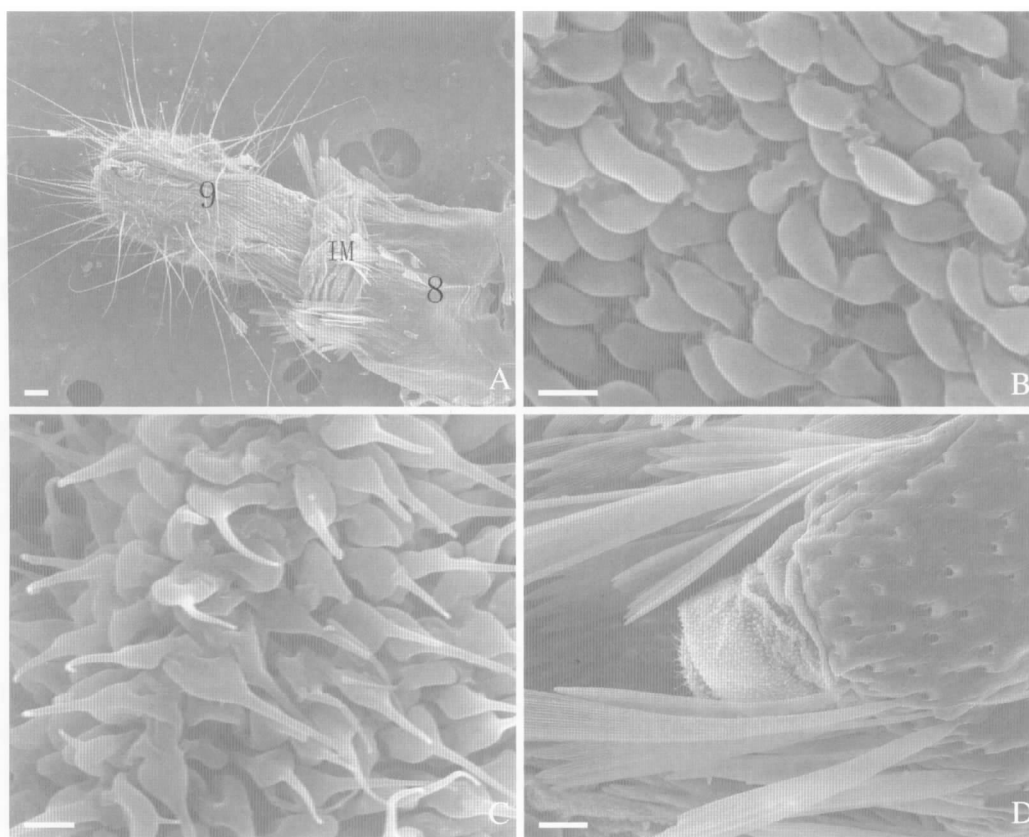


图1 3日龄茶银尺蠖雌蛾腹部末端扫描电镜结果

Fig. 1 Scanning electron micrographs (SEM) of the terminal abdominal segments of the mature (3 days old) female *Scopula subpunctaria*

A: 雌蛾第8、9/10腹节以及其间的节间膜(IM), 背面观 Dorsal view of terminal abdominal segments 8 and 9/10 showing the intersegmental membrane (IM) between abdominal segments 8 and 9/10; B: 位于节间膜上的长圆丘状突起 Long dome-shaped microtrichiae of the IM; C: 位于节间膜上基部膨大的长刺状突起 Spiny microtrichiae with enlarged base of the IM; D: 2种突起的着生位置 The position of tow kinds of microtrichiae. 标尺 Scale bar: A and D = 50 μm ; B and C = 2 μm .

2.2 性信息素腺体细胞的超微结构

经透射电镜对发育不同阶段雌蛾腹尖的观察发现,腺体细胞在个体大小以及其内部各种细胞器的种类、数量和形态上都随细胞的发育状态不同而存在较大差异。

2.2.1 成熟雌蛾(3日龄)性腺细胞的超微结构

透射电镜结果(图2)表明,性腺细胞呈单层分布在节间膜表皮下方。由于着色程度不同将表皮(cuticle)分为上表皮(epicuticle)和内表皮(endocuticle)(图2:A)。着色较深的为上表皮,厚度约为0.05 μm ,而极度增厚的下表皮着色较浅,由多层薄片组织构成,厚度因在节间膜所处位置不同而不定,最厚可达2.75 μm 。在两层表皮的表

面或横截面均未发现有明显的管道或孔状结构。在内表皮下方是腺体细胞特有的一层厚约1~1.5 μm 的微绒毛(microvilli)结构(图2:A)。性腺细胞往往都具有较大的圆形或椭圆形细胞核(nucleus),表面通常伴有明显的缺刻和凸起,异染色质(heterochromatin)分散在核质内并与内核膜(inner nuclear membrane)相连。大量的游离核糖体(free ribosomes)组成了细胞质基质的基础部分,在胞质内明显可见发达的粗面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER)紧邻于细胞核外(图2:B)。在其周围伴随有大量大小不一的透明囊泡(vesicles)(图2:B, C)。大量线粒体(mitochondria)均匀分布在整个细胞质中,形状从

两端膨大的棒状到椭圆形不等。在其周围往往紧密分布有大量淡灰色圆形脂滴(lipid droplets),其表面相对圆滑,因发育程度不同而大小不一(图2:B)。细胞间明显可见发达的细胞间隙,并伴有细胞桥粒(desmosome)的存在(图2:C)。细胞质膜在面向体内胸腔的一面与一层基膜(basement membrane)紧密连接,这是由细胞外基质组成的特

化结构。质膜紧紧固着于基膜下方,并向胞质内弯曲、折叠形成大量褶皱一直延伸到细胞内部,这一结构称为质膜内褶(plasma membrane infoldings)(图2:A)。其存在扩大了细胞基底部分的表面积,并在邻近周围可观察到大量线粒体的存在(图2:C)。

2.2.2 未发育成熟雌蛾(羽化5 h内)性腺细胞

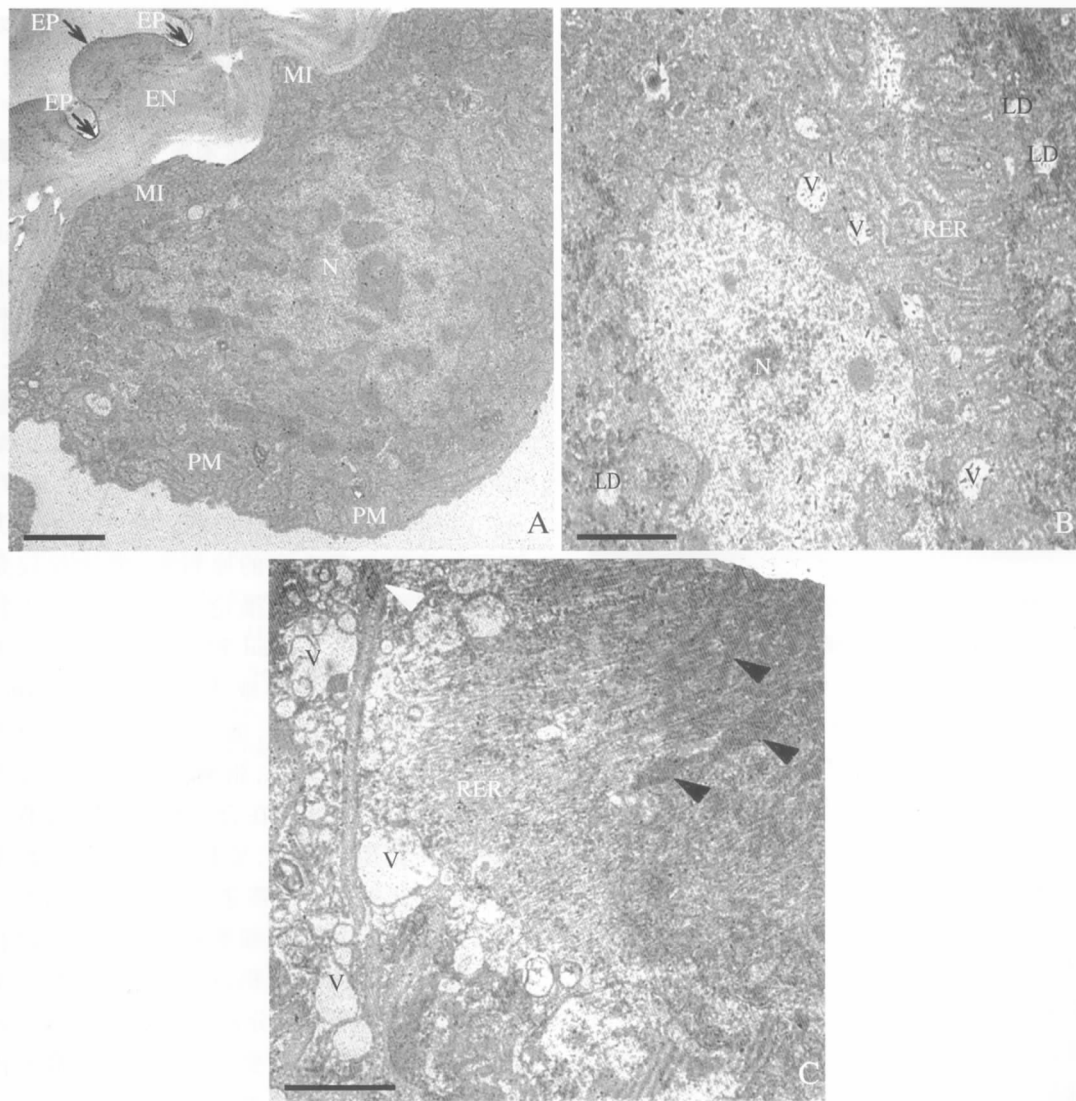


图2 成熟雌蛾(3日龄)性腺细胞的透射电镜观察

Fig.2 Electron micrographs of the pheromone gland cells of mature (3days old) female moth

- A. 腺体细胞及其表皮结构 Structure of gland cell and cuticle; B. 腺体细胞结构 Structure of gland cells;
C. 腺体细胞间结构 Structure between two gland cells.

上表皮(epicuticle, EP),质膜内褶(plasma membrane infoldings, PM),下表皮(endocuticle, EN),微绒毛(microvilli, MI),细胞核(nucleus, N),粗面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER),脂滴(lipid droplets, LD),囊泡(vesicles, V),细胞桥粒(desmosome, 白色箭头 white triangle)、线粒体(mitochondria, 黑色三角 black triangle). 标尺 Scale bar: A-C = 2 μ m.

的超微结构 透射电镜结果显示,羽化 5 h 内雌蛾的节间膜上皮细胞与成熟雌蛾的相比存在较大差异(图 3)。首先细胞形态相对较小或扁平,细胞核同样如此,而且核内染色质相对较集中,有些甚至无明显的核结构存在。胞质内充满密集分布的粗面内质网,线粒体穿插在其中。此外,还有少量运输小泡和孔道等结构,但未看到有明显的脂滴存在,尤其是微绒毛、发达的质膜内褶和过度增厚的表皮结构等均未发现。

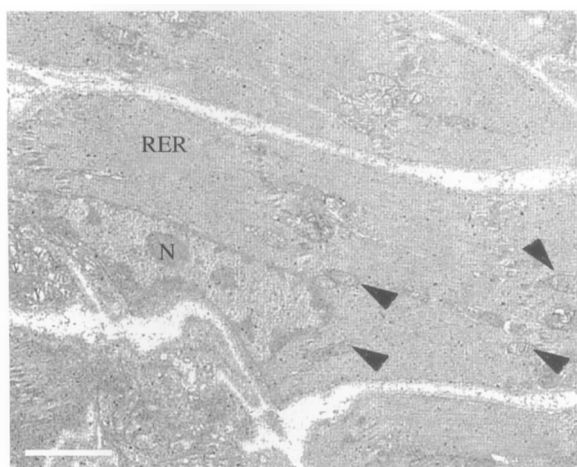


图 3 未成熟雌蛾(羽化 5 h)性腺细胞透射电镜观察
Fig. 3 Electron micrographs of the pheromone gland cells of immature (in 5 h after eclosion) female moth

细胞核(nucleus, N)、线粒体(mitochondria, 黑色三角 black triangle)、囊泡(vesicles, V). 标尺

Scale bar = 2 μm .

3 讨论

经扫描电镜、透射电镜对 3 日龄茶银尺蠖雌蛾腹部末端的观察结果证实,其节间膜上皮细胞的外部形态和超微结构均具有典型的性信息素内分泌腺细胞的特点:整体外形呈现凸起的长圆丘状或基部膨大的长刺状,超微结构显示其含有丰富的线粒体、脂滴、粗面内质网和发达的微绒毛、质膜内褶和极度增厚的表皮等结构(Percy and MacDonald, 1987)。因此判断茶银尺蠖雌蛾位于节间膜上的上皮细胞就是产生性信息素的腺体细胞。但根据国内外报道来看,有些种类的鳞翅目昆虫的性腺细胞不仅仅限于节间膜的位置(Chow *et al.*, 1976; Sreng *et al.*, 1988)。因此,需要待性

信息素成分分析结果出来之后再对有可能有性腺细胞存在的位置通过气相色谱分析技术再做进一步成分对比分析来确定。众多关于鳞翅目性信息素腺体超微结构的研究报道证实,具有发达的光面内质网是性腺细胞普遍存在的特点(Percy and MacDonald, 1987)。但在本实验中仅发现少量类似于分支管状的光面内质网存在,其原因可能是由于在透镜材料准备过程中的人为丢失,类似的情况同样发生在 Waku 和 Sumimoto(1969)对于蚕蛾 *Bombyx mori* 的研究, Ma 和 Roelofs(2002)对于欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 的研究中。

经实验对比发现,在未发育完全的性腺细胞中脂滴、微绒毛、质膜内褶和过度增厚的内表皮等细胞结构明显缺失,尤其是运输小泡和孔道结构明显减少,因此推测以上结构均与信息素的合成或释放有关。但关于细胞质内各种细胞结构和器官在信息素合成中所起的作用仍存在较大争议。国内外已经有大量报道发现鳞翅目昆虫性腺细胞中脂滴的数量、直径往往与其信息素的含量成正比(Waku and Sumimoto, 1969; Percy, 1979; Ma and Roelofs, 1995; 向玉勇等, 2008),因此判断脂滴可能是信息素生产的原料库,但这仅仅是基于形态学观察而得出的推论,缺乏足够的生物化学相关实验证据。Bjostad 和 Roelofs(1986), Bjostad 等(1987)在对红带卷蛾 *Argyrotaenia velutinana* 和欧洲玉米螟的研究中,通过使用稳定同位素标记信息素合成前体发现,脂滴不是合成信息素的原料库,相反,它是细胞在合成信息素的过程中产生废料的存储地。因此,要探明脂滴在信息素生物合成中所起到的作用需进行进一步的研究。质膜内褶与微绒毛是性腺细胞最具特点的结构,两者均能扩大细胞的表面积,前者有利于水和电解质的迅速转运以便适应分泌细胞快速合成时需向胞内运输大量物质的需要;后者则与细胞分泌物向胞外运输有关。而这些过程均需要消耗大量能量,因此在两者周围能够观察到大量线粒体存在(张钦宪等, 2008)。大量研究表明信息素是通过表皮结构扩散到胞外的, Ma 和 Roelofs(2002), Raina 等(2000)均观察到内表皮的细胞间隙处存在大量孔道,这些孔道结构被认为是信息素向胞外运输的重要路径。对于不同发育阶段雌蛾性腺细胞超微结构的观察可以对性信息素生物合成途径及释放机理的研究提供一定的理论基础,但这

仅是基于形态学观察所得出的推论,所以仍需在生化和分子水平上进行更加深入细致的研究和论证。

参考文献 (References)

- Bjostad LB, Roelofs WL, 1986. Sex pheromone biosynthesis in the redbanded leafroller moth, studied by mass-labeling with stabled isotopes and analysis with mass spectrometry. *J. Chem. Ecol.*, 12(2):431—450.
- Bjostad LB, Wolf WA, Roelofs WL, 1987. Pheromone biosynthesis in lepidopterans: Denaturation and chain shortening//Prestwich GJ (ed.). *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, Orlando, FL. 77—120.
- Chow YS, 1976. Anatomy of the female sex pheromne gland of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellide). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 5(3):197—203.
- 丁锦华,徐雍皋,李希平,1980. 植物保护辞典. 安徽:安徽科学技术出版社. 291.
- Howes PE, Stevens IDR, Jones OT, 1998. *Insect Pheromones and Their Use in Pest Management*. Chapman& Hall. 103—132.
- Ma PWK, Roelofs WL, 1995. Sites of synthesis and release of PBAN-like factor in female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.*, 41(4):339—350.
- Ma PWK, Roelofs WL, 2002. Sex pheromone gland of the female european corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae): ultrastructural and biochemical evidences. *Zool. Soci. Jpn.*, 19(5):501—511.
- Percy J, 1979. Development and ultrastructure of sex-pheromone gland cells in females of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. J. Zool.*, 57:220—236.
- Percy JE, MacDonald JA, 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands// Prestwick GD, Blomquist GJ (eds.). *Pheromonebiochemistry*. Academic Press, Orlando. 27—75.
- Raina AK, Wergin WP, Murphy CA, Erbe EF, 2000. Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. *Arthropod Struct. Dev.*, 29(4):343—353.
- Sreng I, Sreng L, 1988. Fine structure of the female sex pheromone-producing glands in *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 17(4/5):345—357.
- Waku Y, Sumimoto K, 1969. Ultrastructure and secretory mechanism of the alluring gland cell in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, 4:135—146.
- 向玉勇,杨茂发,李子忠,2008. 小地老虎性信息素分泌腺体的部位及其超微结构. 浙江大学学报(理学版), 35(6):690—695.
- 张钦宪,邹丹,丁一主编,2008. 组织学与胚胎学(第三版). 郑州:郑州大学出版社. 28—29.
- 赵连吉,王兆荣,赵博,张晓光,2003. 昆虫信息素在害虫防治上的应用. 吉林林业科技, 32(2):68—69.