

研究论文

棕尾别麻蝇雄性附腺分泌物的生理功能

高 熹^{1*} 吴国星¹ 叶恭银^{2**} 潘贤丽³(1. 云南农业大学植物保护学院 昆明 650201; 2. 浙江大学应用昆虫学研究所 杭州 310029
3. 华南热带农业大学海口分校 海口 570011)

Physiological function of male accessory gland secretions of *Boettcherisca peregrina*. GAO Xi¹, WU Guo-Xing¹, YE Gong-Yin^{2*}, PAN Xian-Li³ (1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hanzhou 310029, China; 3. South China University of Tropical Agriculture, Haikou 571737, China)

Abstract Secretions of male accessory gland of *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy contain a variety of bioactive molecules. We injected the gland extracts from mature males to the abdomen of virgin females and found that it affected virtually many aspects of the female's reproductive activity. Injections secretion inhibited the remate rate; increased the egg number; shorten the longevity of female adults. Furthermore, the secretions also inhibited the growth of Gram-positive bacteria.

Key words *Boettcherisca peregrina*, male accessory gland, fecundity, antimicrobial activity

摘 要 棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy 雄性附腺的分泌物中包含许多生物活性分子, 将成熟的雄性附腺分泌物注射到未交配的雌虫体内, 发现其能影响雌虫生殖活性的很多方面: 如降低雌虫的再次交配率; 增加卵巢内的含卵量; 缩短交配后雌虫的寿命。另外, 还证明附腺分泌物中存在有可抑制革兰氏阳性菌的物质的存在。

关键词 棕尾别麻蝇, 雄性附腺, 生殖力, 抑菌活性

昆虫的雄性附腺 (male accessory gland, MAG) 是其内生殖系统的重要组成部分。MAG 分泌物的功能研究始于 20 世纪 80 年代。在较原始的昆虫目中, MAG 分泌物与精子结合形成一种或多种囊状的结构——精包, 精子以精包的形式进入雌虫生殖道内。然而, 精子转移的促进作用不是 MAG 分泌物的惟一功能。从精子进入雌虫生殖道到产卵, MAG 分泌物在影响交配后雌虫的生殖生物学上起着重要的作用。MAG 的分泌物中包含许多生物活性分子。在交配时, 这些分子对雌虫的生殖活性有很大的影响, 几乎包括雌虫生殖行为的所有方面。如对精子的保护, 贮存和活化, 增强精子的竞争力 (影响竞争者的精子), 改变雌虫的行为 (显著诱导性不敏感性, 降低性吸引力), 增强产卵力, 促

进排卵, 对产出卵的进行化学上的保护等^[1]。

近 20 年以来, 在国外 MAG 的研究已成热点, 如 MAG 的结构与发育^[2], MAG 分泌物活性的内分泌调控^[3, 4], 在产卵中的作用 (包括婚礼的礼物)^[5] 及对卵的保护^[1] 等。已知的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 的基因组, 与它的生化、生理、基因分析的适应性相结合, 使这一物种的 MAG 功能成为到目前为止最受广泛深入研究的对象, 无论是传统的遗传学, 还是现代的基因组学技术都已融入到实验研究中。MAG 分泌物的分子来源和它们的特殊功能在

* E-mail: chonchon@163.com

** 通讯作者: E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期: 2006-11-09, 修回日期: 2007-04-03

接受日期: 2007-05-11

近年来的研究中有了快速的发展。到现在为止,约有 75 种的 *Drosophila* 的 MAG 基因和它们的产物得以鉴定(约占了 90%)^[6, 7]。

然而,到目前为止还未见麻蝇科 MAG 的研究报道。棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* Robinean-Desvoidy 为腐食性昆虫,广泛分布于古北区,东洋区,大洋洲区及东非岛屿^[8]。因其雌虫生殖方式为卵胎生,与其他昆虫相比较,在遗传进化上有一定的特殊性,因此本实验采用棕尾别麻蝇作为实验材料,旨在揭示 MAG 对卵胎生昆虫的雌性生殖上所产生的影响。以下是 MAG 分泌物对雌蝇的几方面生理功能产生影响的初步试验结果。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棕尾别麻蝇以采自杭州市的卵、幼虫或成虫建立种群。于成虫产卵盛期以新鲜猪肝供其产卵,取 2~3 h 所产卵接入培养箱中果酱瓶内,以新鲜瘦猪肉饲养。幼虫进入离食期后将其与饲料分离,置果酱瓶中,加入干燥锯末供其化蛹。成虫用新鲜的糖和水进行饲养。养虫室温度为(25±2)℃,相对湿度为 75%±5%,光周期为 12L:12D。根据实验的不同要求,选取羽化后不同时间的成虫进行实验。

1.2 MAG 发育过程中的蛋白质含量测定及电泳(SDS-PAGE)

从成虫羽化当天起,选取不同日龄的雄虫,解剖出 MAG,在冰上立即进行轻轻匀浆。匀浆液转入预冷的离心管中,在 12 000 g 的离心力下 4℃离心 25 min。离心后,小心除去上层脂肪层,收集中间层清液。沉淀用双蒸水清洗 3 次,离心,将上清液也转入离心管内。蛋白含量的测定方法参照 Bradford 的方法^[9]。

按 King 的方法^[10]将样品在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行 SDS-PAGE 电泳分析,每孔上样量为 10 附腺当量。低分子量蛋白 Marker 的组成为 β-牛乳糖(β-galactosidase, 116)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, 66.2)、卵清蛋白(ovalbumin, 45)、乳酸脱氢酶(lactate

dehydrogenase, 35)、限制性内切酶 BSP 981(restriction endonuclease BSP 981, 25)、β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, 18.4)和溶菌酶(lysozyme, 14.4)。电泳完毕后,考马斯亮蓝 R-250 进行染色,脱色液(甲醇:冰醋酸:水=1:1:8)脱色。

1.3 生测用 MAG 蛋白干粉的制备

选取 6 日龄的雄虫,取下其 MAG,蛋白粗提的方法同 1.2,最后将收集液进行冷冻干燥,制成蛋白干粉,放入-70℃下贮存,以备生测之用。

1.4 MAG 粗提物对交配率的影响

为确定附腺蛋白粗提物对雌虫再次交配的影响,以下将采用注射方法,参照 Chapman 等的方法^[11]略作改动。将蛋白干粉溶解于预冷的无菌生理盐水中,分别配成 0.5, 1, 1.5, 2, 4 附腺当量的样品溶液。取 6 日龄未交配的雌虫,先将其在碎冰里冷却约 30 s,待雌虫不动后将它转移到冰盒上,用 Eppendorf 显微注射器在第 4 腹板与第 5 腹板的节间膜处注射 1 μL 粗提物溶液或无菌生理盐水(对照)。将注射好的雌虫在 4℃下恢复 15 min,最后放到广口瓶中,每瓶中事先放入 3 只 6 日龄未交配的雄虫,观察其交配情况,每隔 15~20 min 观察 1 次。

1.5 MAG 粗提物对雌虫含成熟卵量的影响

参照 Lange 和 Loughton 的方法^[12],按 1.4 中的方法分别将不同浓度的 MAG 提取物注入到 6 日龄雌虫体内,用无菌生理盐水及正常交配的雌虫作对照,注射好的雌虫在 4℃下恢复 15 min,放入养虫笼内以糖、水饲养。雌虫注射 24 h 后被解剖,计数卵巢内所含成熟卵的个数。

1.6 MAG 粗提物对雌虫寿命的影响

参照 Chapman 等的方法^[11],按 1.4 中的方法将各不同浓度的 MAG 粗提物注入到 6 日龄的雌虫体内,用无菌生理盐水及正常交配的雌虫作对照,注射好的雌虫在 4℃下恢复 15 min,放入养虫笼内以糖、水饲养。每日观察其死亡情况直至雌虫全部死亡。

1.7 MAG 粗提物抑菌活性测定

将枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、荧光假单胞菌

Pseudomonas fluorescens、大肠杆菌 *Escherichia coli* 接种于 LB 培养基上,培养基上打孔(直径为 3 mm),每孔加 3 μL 无菌的不同浓度的 MAG 粗提物,同时以无菌生理盐水作为负对照,水平置于 4 °C 冰箱中,待样品溶液完全扩散后(约 1 h),再移至 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h。有抑菌圈出现的样品,以游标卡尺量取抑菌圈直径,直径的大小代表其抑菌强度的大小。抑菌活性用直径表示:抑菌圈直径=总直径-孔直径,mm。

1.8 数据处理

所有数据的整理和分析均用 Microsoft 的 EXCEL 2000 软件及唐启义和冯明光的 DPS 数据处理软件进行^[13]。

2 结果与分析

2.1 成虫发育过程中的 MAG 蛋白变化

从图 1 可以看出,MAG 的发育过程实际上是一个蛋白逐渐积累的过程。MAG 蛋白的分泌在羽化后 1 周内增长十分迅速,在初羽化时的蛋白量为 (0.003 ± 0.002) μg/对;到羽化第 4 天即增加到 (0.013 ± 0.005) μg/对,增加了约 3 倍;到羽化后第 6 天,附腺的蛋白分泌出现急剧增长,达到 (0.022 ± 0.012) μg/对,比第 4 天增长了近 1 倍,而后蛋白量的增长趋于缓和,但从总体上来说各时期蛋白量的变化差异还是显著的 ($F_{16,34} = 718.710; P < 0.01$)。与附腺的长宽相似地,附腺的蛋白量在后期也有上下波动的趋势。图 2 显示,成虫羽化后 4 d 内蛋白条带较为稀疏,但主要蛋白带均已经出现,到第 6 天蛋白条带明显加粗,出现了至少有 30 条蛋白带,并出现了某些新条带,其中有 A 和 B 2 条主带

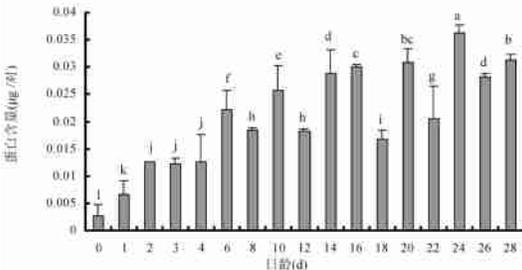


图 1 棕尾别麻蝇雄性附腺蛋白的发育动态

(55 kDa 和 14 kDa),这与上述蛋白含量的测定是相一致的。从第 6 天往后,蛋白条带的变化不明显。

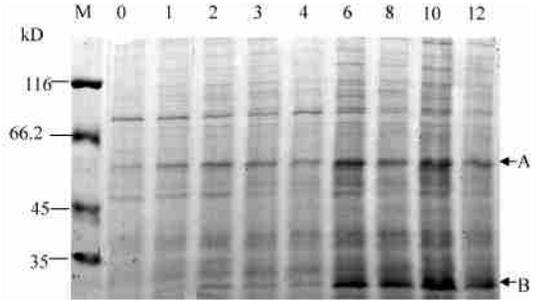


图 2 不同日龄棕尾别麻蝇雄虫 MAG 蛋白电泳图
0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 分别为刚羽化,羽化后 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 d M 为蛋白质分子量标准

2.2 MAG 粗提物对交配率的影响

对雌虫注射生理盐水或 MAG 粗提物后,其抑制交配率见表 1。与未进行注射的雌虫相比,在注射过 MAG 后的 1 h,雌虫的抑制交配率明显增加,除了 1 附腺当量,其他处理浓度均可达到显著差异 ($F_{5,12} = 16.301; P < 0.01$);在 3 h 内,抑制交配率仍保持与 1 h 时相似的趋势,即除 1 附腺当量外,各处理浓度与对照之间差异显著 ($F_{5,12} = 14.112; P < 0.01$)。到了 6 h,对照组雌虫的交配率不再变化,而处理组雌虫的交配率明显上升,且各处理浓度间及对照组间无显著差异 ($F_{5,12} = 0.364; P = 0.8898$)。

表 1 棕尾别麻蝇雌虫注射不同浓度雄性附腺粗提物后不同时间的抑制交配率

注射浓度 (MAG 当量 μL)	抑制交配率(%)		
	1 h	3 h	6 h
CK1(未注射)	38.89 ± 5.09b	16.67 ± 10.00d	16.67 ± 10.00a
CK2(生理盐水)	32.22 ± 5.09b	24.44 ± 3.85cd	23.33 ± 11.71a
0.5	48.02 ± 13.80b	41.03 ± 13.54c	20.63 ± 13.11a
1.0	45.56 ± 5.09b	34.44 ± 5.09c	27.78 ± 8.39a
1.5	78.73 ± 13.22a	64.05 ± 17.75ab	26.11 ± 10.05a
2.0	77.83 ± 10.14a	59.72 ± 9.03b	22.59 ± 13.53a

表中数据为平均值 ± 标准差(mean ± SD),数据后标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 新复极差法)。下表同。

2.3 MAG 粗提物对雌虫含成熟卵量的影响

从图 3 可见,MAG 粗提物对雌虫的含成熟卵量有一定的促进作用。注射剂量为 0.5 当量

μL 时, 每雌虫的含卵量达 55 粒, 而仅注射生理盐水的雌虫含卵量只有 25 粒, 达到了显著差异水平 ($F_{4,10}=9.817; P<0.01$)。

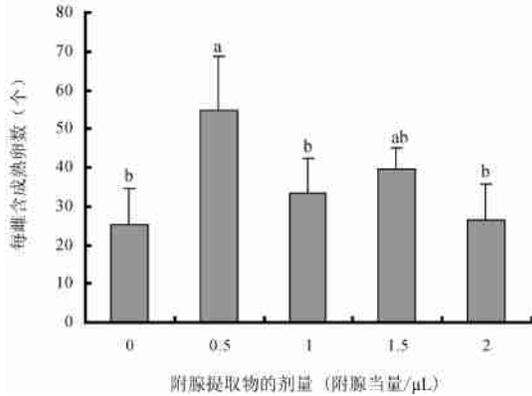


图3 棕尾别麻蝇雌虫注射不同浓度雄性附腺粗提取物后对含成熟卵的影响

2.4 MAG 粗提取物对雌虫寿命的影响

图4 表明, 注射了 MAG 粗提取物的雌虫的死亡率明显上升。注射后的 15 d 内, 注射生理盐水及未经注射的雌虫都保持着较高的存活率, 而注射过 MAG 物质的雌虫有着较陡的死亡曲线; 从总体上看, 4 当量的 MAG 粗提取物注射对雌虫寿命的影响最大, 0.5 当量 μL 的次之, 其它的剂量自 15 d 后便没有表现出明显的区别。

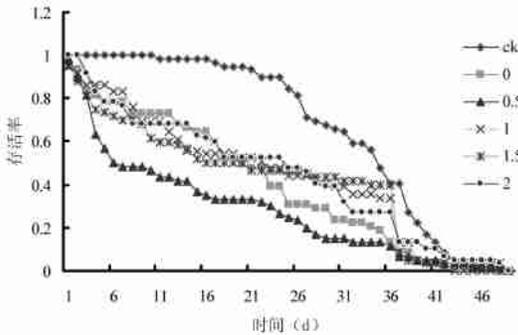


图4 注射雄性附腺粗提取物对棕尾别麻蝇雌虫寿命的影响

2.5 MAG 粗提取物抑菌活性测定

表2 显示, MAG 粗提取物对革兰氏阴性菌如荧光假光单杆菌和大肠杆菌均没有抑菌作用; 但对革兰氏阳性菌表现出了一定的抑菌活性, 与生理盐水相比, MAG 粗提取物对枯草芽孢杆菌

($F_{4,10}=168.048; P<0.01$)和苏云金芽孢杆菌的($F_{4,10}=48.041; P<0.01$)影响差异均显著; 不同浓度的粗提取物对枯草芽孢杆菌的抑制作用有明显差异, 而对苏云金芽孢杆菌的影响则没有太大的区别。

表2 棕尾别麻蝇雄性附腺粗提取物的抑菌圈直径(mm)

注射浓度 (MAG 当量 μL)	抑菌圈直径(mm)			
	枯草芽孢杆菌	苏云金芽孢杆菌	荧光假单胞菌	大肠杆菌
生理盐水	0.00±0.00d	0.00±0.00b	—	—
0.5	1.18±0.08c	0.96±0.29a	—	—
1	1.74±0.09a	1.22±0.09a	—	—
1.5	1.57±0.06b	1.20±0.19a	—	—
2	1.16±0.07c	1.13±0.05a	—	—

3 讨论

经观察, 大约有 80% 的棕尾别麻蝇在羽化后第 6 天进行第 1 次交配, 这与 MAG 蛋白的发育是一致的, 这说明了 MAG 蛋白的分泌、MAG 发育及雄蝇的交配之间可能存在着某种联系。因此后来我们在 MAG 功能生测时选用了 6 日龄的雄虫 MAG 作为注射样品。此外, 在先前的实验中, 我们通过 SDS-PAGE 发现交配后 24 h 内雄虫的 MAG 物质在交配后迅速减少, 再有, 对于绝大多数昆虫而言, MAG 及其生殖因子对雌虫的影响仅是暂时的, 而非长久的^[14]。故我们选择在注射 24 h 后对雌虫进行解剖。

在成功的交配后, 许多物种的雌性(特别是双翅目)在一定的时间内不愿再次交配, 不愿交配可以看作是对雄虫的积极拒绝(不应性)。通过分泌物的生化分析表明影响物是肽或是蛋白(配偶素)(如 *Drosophila* 和 *Musca* 和 *Cochliomyia*)^[11]。双翅目昆虫如黑腹果蝇 MAG 主细胞所分泌的性肽 SP (sex peptide) 具有抑制再交配的功能^[15]。 *D. funebris* 附腺分泌物中的一种多肽则削弱已交配雌虫性接纳力^[14]。在本实验中, 注射过 MAG 粗提取物的棕尾别麻蝇雌虫在面对雄虫时, 表现出了积极的躲避行为, 这种现象大约在注射 1~3 h 内发生, 此后雌雄蝇又恢复正常交配。这表明棕尾别麻蝇 MAG

分泌物中含有可抑制雌虫性接纳力的物质,且该种物质有短期效应而没有长期的作用效能。目前对于抑制交配蛋白的作用位点存在 2 点争议:一种是它们能通过薄的生殖道壁,进入雌虫血腔,影响雌虫生理行为^[16];另一种是它们的作用位点是神经系统,由受精囊中的化学感受器传到腹末神经索,途经大脑,最后到达雌虫身体的其他部位^[1]。本实验中未涉及到此方面的研究,有待日后制备出抗体后继续开展实验。

黑腹果蝇附腺中具乙醇胺半乳糖苷且富含丙氨酸的多肽,能提高产卵量。Chen 等将纯化的刺激产卵的附腺多肽注射到刚羽化的处女蝇中也表现相应的作用;且它对 *D. simulans*、*D. mauritiana*、*D. sechellia* 的雌蝇也具活性,然而对亲缘关系较远的 *D. furebris* 则无作用^[15]。通过基因敲除的方法也可证明附腺的主细胞对黑腹果蝇有提高产卵率和降低再交配敏感性的作用^[17]。本研究表明 MAG 粗提物对雌虫的含成熟卵量有一定的促进作用,这证明在棕尾别麻蝇的雄性附腺中具有促进产卵蛋白的存在,这为我们以后提取纯化该种蛋白打下基础。

果蝇 MAG 主细胞的产物能缩短雌虫的寿命,即增加交配后雌虫的死亡率^[11]。注射后 MAG 粗提物的棕尾别麻蝇雌虫寿命也明显缩短,与前人的报道相似。Chapman 等假设是少量的 Acp26F 进入了血淋巴,对缩短交配的雌虫寿命起了作用,也许是干扰了调控必要胞内过程的蛋白酶的功能,如免疫反应^[11]。然而,到目前为止,没有人就究竟是何种物质以何种方式缩短了雌虫的寿命做过深入研究,这在以后的研究中需要得以加以重视。

由于昆虫的生殖道直接与体内环境相连,因此极易受到微生物的入侵。为了防止有害细菌或真菌的入侵,许多动物包括昆虫都能在它们的生殖道内产生抗菌肽。自黑腹果蝇的 MAG 中转移到雌虫体内的 6 kDa 和 28 kDa 的蛋白都具有抗细菌的活性。这些蛋白起源于附腺和射精管,可能在交配过程中比精子先转入到雌虫体内,使得交配后的雌虫的生殖道和卵都能抵抗细菌的侵袭^[16]。且在精子进入后,在

雄虫生殖道内的这些蛋白可以保护精子免受细菌的侵袭^[18, 19]。但是,一旦精液随着雌虫的产卵排出体外,这些抗菌物质可能都随之排出,因此它们在雌虫体内只是暂时的贮存^[18]。在本实验中,我们用常规的方法证明 MAG 中存在有抑菌蛋白,但其抑菌活性不是太高,可能与 MAG 较小,抗菌肽含量较少有关;究竟是何种抗菌肽,是一种或是几种抑菌蛋白综合起作用,这一切均有待于进一步的研究。

昆虫生殖生理的研究现已成为国际上研究的热点,本试验已测定出棕尾别麻蝇的 MAG 粗提物对雌虫可产生生理活性,为下一步提取出专一的活性因子及其克隆相关基因进行功能分析打下基础,期望可从生殖的角度找到一条切实可行的害虫控制及益虫利用的途径。

参 考 文 献

- Gillott C. *Annu. Rev. Entomol.*, 2003, **48**: 163~184.
- Happ G. M. *Annu. Rev. Entomol.*, 1992, **37**: 303~320.
- Gillott C. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 1996, **30**: 199~205.
- Gillott C., Gaines S. B. *Can. Entomol.*, 1992, **124**: 871~886.
- Vahed K. *Biol. Rev.*, 1998, **73**: 43~78.
- Swanson W. J., Clark A. G., Waldrip-Dail H. M., Wolfner M. F., Aquadro C. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(13): 7375~7379.
- Wolfner M. F., Harada H. A., Bertram M. J., Stelick T. J., Kraus K. W. *et al. Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1997, **27**(10): 825~834.
- 胡萃, 闵建雄. 法医昆虫学. 2000, 重庆: 重庆出版社. 162~172.
- Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248~254.
- King J., Laemmli U. K. *J. Mol. Biol.*, 1971, **62**(3): 465~477.
- Chapman T., Liddle L. F., Kalb J. M., Wolfner M. F., Partridge L. *Nature* 1995, **373**(19): 241~244.
- Lange A. B., Loughton B. G. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1985, **57**(2): 208~215.
- 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社. 2002. 33~59.
- Chen P. S. *Annu. Rev. Entomol.*, 1984, **29**: 233~255.
- Chen P. S., Stumm-Zollinger E., Aigaki T., Balmer J., Blenz M., Bohlen P. *Cell*, 1988, **54**(3): 291~298.
- Lung O., Wolfner M. F. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1999, **29**(12): 1043~1052.
- Kalb J. M., DiBenetoo A. J., Wolfner M. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**(17): 8093~8097.
- Lung O., Wolfner M. F. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 2001, **31**: 543~551.
- Samakovlis C., Kylsten P., Kimbrell D. A., Engstrom A., Hultmark A. *EMBO J.*, 1991, **10**(1): 163~169.