

桑天牛产卵分泌物与雌虫内生殖器官内容物组分的比较^{*}

金凤^{1 2 **} 嵇保中^{2 ***} 刘曙雯³ 田铃² 高洁²

(1. 金陵科技学院园艺学院 南京 210038; 2. 南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037;

3. 江苏省南京中山陵园管理局 南京 210014)

摘要 本文对桑天牛 *Apriona germari* Hope 产卵分泌物和各生殖器官内容物的鲜重、蛋白质、还原性糖、游离氨基酸等含量进行了测定及对比分析。结果表明,产卵分泌物鲜重与输卵管内容物鲜重差异显著,而与交配囊、受精囊腺内容物鲜重差异不明显;产卵分泌物的蛋白质含量显著高于输卵管内容物的蛋白质含量;产卵分泌物的还原性糖含量显著低于交配囊内容物的还原性糖含量;产卵分泌物的游离氨基酸含量显著高于交配囊内容物中游离氨基酸含量。产卵分泌物中蛋白质、还原性糖、游离氨基酸等的含量与受精囊腺内容物相应成分含量均无显著差异,即受精囊腺是其贮藏器官。

关键词 分泌物,贮藏器官,受精囊腺,桑天牛,蛋白质

Comparison of fresh weight and components between oviposition secretions and contents of internal reproductive organs in *Apriona germari*

JIN Feng^{1 2 **} JI Bao-Zhong^{2 ***} LIU Shu-Wen³ TIAN Ling² GAO Jie²

(1. Department of Horticulture Jinling College of Science and Technology, Nanjing 210038, China;

2. College of Forest Resources and Environment Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

3. The Administration of Dr Sun Yat-sen's Mausoleum, Nanjing 210014, China)

Abstract *Apriona germari* Hope female adults were dissected just after the oviposition secretion had been collected and samples of the contents of the bursa copulatrix, the calyx and the spermathecal gland were obtained and analysed. The fresh weight and percentage weight of protein, reducing sugar and free amino acids of the secretion and the contents of the sampled organs were determined. Significant differences were observed in the fresh weight of the oviposition secretion and the content of the calyx. However there was no significant difference in fresh weight between the oviposition secretion and the content of other reproductive organs. Percentage weight of protein in the oviposition secretion was much higher than that in the content of the calyx. Percentage weight of reducing sugar in the secretion was obviously lower than in the content of the bursa copulatrix. The oviposition secretion had a higher percentage weight of free amino acids than the content of the bursa copulatrix. There were no significant differences in the percentage weight of protein, soluble sugar and free amino acid between the oviposition secretion and the content of the spermathecal gland. These results suggest that the oviposition secretion is stored in the spermathecal gland.

Key words *Apriona germari*, secretion, store organ, spermathecal gland, protein

产卵分泌物是昆虫产卵行为的一种适应,是昆虫种群长期进化的产物,对卵的保护和胚胎发育环境的营造有重要作用,也是昆虫与寄主间、昆虫与天敌间以及昆虫种间种内化学生态信息传递

* 资助项目:国家自然科学基金项目(30271086, 30471399)、江苏省高校自然科学基金研究计划项目(04KJB180053)。

** E-mail: jf888@126.com

*** 通讯作者, E-mail: jbz9885@njfu.edu.cn

收稿日期:2010-05-07, 接受日期:2010-08-13

的重要物质基础。多数植物表面产卵昆虫的雌性附腺是产卵分泌物的主要来源器官,并在产卵时同时分泌。如鳞翅目家蚕 *Bombyx mori* (Masculus)、柞蚕 *Antherea pernyi* (Guerin-Meneville)、柳蚕 *Actias selene* (Hübner) 等昆虫固定卵的胶状物是由雌性附腺——粘腺分泌的(靳远祥等 2005);而昆虫产卵分泌物中的产卵标记信息素也有来自雌性附腺的,如双翅目白蛉 *Lutzomyia longipalpis* 的产卵刺激信息素就是由雌虫附腺分泌的(Dougherty and Hamilton, 1997);地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann) 雌虫的生殖附腺还产生具有抗菌活性的角毒素肽类分泌物包裹卵表形成抗菌外衣(Marchini *et al.*, 1997)。卵或卵块表面具有特殊保护物的昆虫,一般都是由雌性附腺的分泌物形成对卵的保护物。蝗虫科的卵鞘主要是由卵巢管腺和侧输卵管前端的卵巢萼延伸成的附腺所分泌的物质形成的;螳螂科的海绵状坚硬卵鞘,则是由一对开口于中输卵管的附腺分泌的粘液混和空气气泡而组成;而蜚蠊的卵夹主要由开口于生殖腔背壁的一对胶腺分泌形成(王荫长, 2001)。而桑天牛 *Apriona germari* Hope 等具有刻槽产卵习性的种类,其产卵分泌物产生于卵排出后,与植物表面产卵昆虫及卵外具有特殊保护物昆虫的产卵分泌物排出的时期明显不同,此类产卵分泌物来源研究报道较少。对松墨天牛 *Monochamus alternatus* (Hope) 雌虫受精囊腺的解剖观察发现,活虫的受精囊腺内含物呈无色或淡黄色透明液体状,而死虫的受精囊腺内含物呈琥珀色透明胶状物,其颜色和性状与刻槽上沉积的产卵分泌物极相似,因此认为受精囊腺是松墨天牛产卵分泌物的贮藏器官,而且进一步研究雌虫对同种其他个体受精囊腺内含物和产卵分泌物的产卵反应表明,受精囊腺内含物同刻槽上沉积的产卵分泌物一样,含有产卵抑制化合物(Hisashi and Katsumi, 2000)。本文系统地分析桑天牛产卵分泌物与各内生生殖器官内容物中各成分含量的关系,初步明确了桑天牛产卵分泌物的器官来源,为阐明桑天牛雌虫对卵的保护机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试虫源

于 2006 年 6 月中、下旬开始采

集桑天牛雌成虫,主要采集地点为南京幕府山行知园一侧林缘地带。所采成虫在实验室内室温下单笼人工饲养,用水插构树枝条供其补充营养和产卵,每隔 1 天换构树枝条 1 次。室内饲养 3 d 后,将雄虫放入雌虫笼中,供雌虫交配。观察记录雌虫日产卵量,日产卵量较稳定的作为实验用虫。

1.1.2 主要仪器 UV-4201 紫外/可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司生产);TGL-46G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.1.3 试剂 茚三酮(AR.) 国药集团化学试剂有限公司;牛血清白蛋白, Sigma 分装;蒽酮等其它试剂均采用市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 产卵分泌物的收集 准备干净的称量瓶,编号,称重。单笼饲养的雌虫开始咬槽时,去其笼罩,准备取样。大量雌虫产卵过程的观察发现,产卵分泌物主要于雌虫成功排出卵后开始分泌。在桑天牛的卵被排入刻槽内、产卵器刚刚从刻槽抽出缩回体内时,即用称量瓶套住腹部末端,直至桑天牛封槽动作结束。立即称重,计算出分泌物鲜重后,用定量冷 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释,移入离心管中冷冻保存,备用。

1.2.2 雌虫各内生生殖器官内容物样品制备 取刚采集了分泌物的雌虫,将其剪去翅、足后,用解剖剪沿成虫腹部气门线,由腹末一直剪至胸部后缘,剪时剪尖紧贴体壁。两侧体壁剪开后,再沿胸腹部交接处横向剪开腹部背板。将虫体固定在蜡盘中,加冷的生理盐水(NaCl 6.8 g, CaCl₂ 0.2 g, KCl 0.2 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.2 g, NaHCO₃ 0.15 g, 葡萄糖 7.7 g, 双蒸水 1 000 mL)至浸没虫体,在体视显微镜下,除去腹部背板、消化道、气管等器官组织。桑天牛雌虫内生生殖器官主要包括输卵管萼、侧输卵管、中输卵管、生殖板、阴道、交配囊、受精囊、受精囊腺、泄殖腔等(金凤等 2007),其中有贮藏功能有交配囊、受精囊腺,产卵期雌虫的输卵管萼膨大,可储存成熟待产的卵,也有一定的贮藏功能。因此,解剖获得输卵管萼、交配囊、受精囊腺等组织器官及其内容物,经磷酸盐缓冲液(pH 7.0)漂洗后称重,移入加有定量 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)的离心管中,剪碎,冰浴中充分搅拌,4 ℃ 下 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液,冷冻保存,备用。沉淀部

分称重用于计算内容物鲜重。

1.2.3 可溶性蛋白质、糖、游离氨基酸的测定

蛋白质含量测定:主要采用 Bradford 法(张龙翔 2003)。用 600 μL 预冷的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解刚刚采集到的分泌物,放入离心管冷冻保存,待测。解剖获得的各生殖器官及其内容物分别放入 1 mL 预冷的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,剪碎,离心,取上清液待测。标准蛋白溶液为 0.1 g/L 牛血清白蛋白溶液,用 0.15 mol/L NaCl 溶液配成。采用微量法制作标准曲线并测定样品 A_{595} 值。重复 1 次。

还原性糖含量测定:主要采用蒽酮比色法(李合生 2000)。取分泌物和各内生殖器官及其内容物样品液,分别加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀去除蛋白质,10 000 rpm 下冷冻离心 10 min,取上清液待测。标准液为 0.1 g/L 葡萄糖溶液,蒸馏水配制,测定 620 nm 处标准液和样品液的吸光值。重复 1 次。

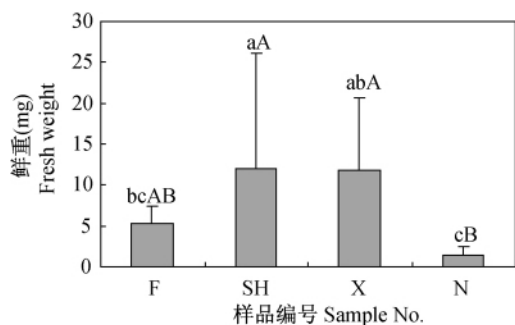


图 1 分泌物、各内生殖器官内容物鲜重比较

Fig. 1 Determination and comparison of the fresh weight of the oviposition secretion and the content of every reproductive organs

图中不同大写字母表示 1% 水平差异显著,不同小写字母表示 5% 水平差异显著(Duncan's 法);样品编号:F—分泌物;SH—输卵管萼;N—交配囊;X—受精囊腺(以下图中样品编号意义相同)。

Different letters in the figure are significantly different (Duncan's test), small letters $P < 0.05$, capital letters $P < 0.01$. Sample No.: F—the oviposition secretion, SH—the bursa copulatrix, N—the calyx, X—the spermathecal gland (the same below).

游离氨基酸含量测定:主要采用茚三酮显色法(文树基,1994)。取样品液按 2 倍体积加入 10% 茚三酮水杨酸,10 000 rpm 下冷冻离心 20 min,去除蛋白质,备测。标准氨基酸溶液为 56.7 mg/L

赖氨酸溶液,重蒸水配制,测定 570 nm 处标准液及样品液吸光值。重复 1 次。

1.3 数据统计与分析

所有试验数据采用 Excel 软件进行统计分析。利用 Duncan's 新复极差法比较分泌物与各内生殖器官内容物鲜重差异。利用配对 t 检验分别分析比较分泌物与各内生殖器官内容物的蛋白质、还原性糖和游离氨基酸等含量之间的差异。

2 结果与分析

2.1 分泌物与各内生殖器官内容物鲜重的比较

采集 20 头雌虫的产卵分泌物后,立即解剖获得此 20 头雌虫的输卵管萼、交配囊、受精囊腺等器官及其内含物,测取内容物鲜重,结果见图 1。雌虫产卵分泌物的平均鲜重高于交配囊内含物的平均鲜重,但低于输卵管萼内容物、受精囊腺内容物等的鲜重。对数据进行方差分析后,结果为:分泌物鲜重与输卵管萼内容物鲜重差异显著,而与交配囊、受精囊腺内容物鲜重差异不明显。

对雌虫产卵行为的大量观察表明,分泌物是在产卵后一次性分泌的,来自雌虫的内生殖器官。综合对雌虫生殖器官解剖构造的观察以及分泌物鲜重的测量、比较结果,可以得出分泌物在内生殖器官中有贮藏器官,但可能存在多个贮藏器官,也可能只有一个贮藏器官。雌虫内生殖器官中有贮藏功能或暂时贮藏功能的器官主要有输卵管萼部、交配囊和受精囊腺,这些器官都可能是分泌物的贮藏器官。其中,交配囊的功能主要与雌雄虫交配接受和贮藏精子有关,其内容物的平均鲜重低于分泌物的平均鲜重,所以,交配囊不是分泌物的贮藏器官,但仍可能是分泌物中部分成分的来源。

2.2 分泌物与各内生殖器官内容物组分的比较

15 头雌虫的分泌物及其各部分内生殖器官的内容物,分 3 组分别进行蛋白质、还原性糖和游离氨基酸等含量的测定(图 2~4)。其中各类组分测定所使用的标准曲线(y : mg/L, x : O. D. 值)分别为:蛋白质含量测定: $y = (x - 0.0003) / 0.0014$ (微量法 $r = 0.9974$); $y = (x - 0.0012) / 0.0005$ (常量法: $r = 0.9967$);还原性糖含量测定: $y = (x - 0.0004) / 0.0048$ ($r = 0.9988$);游离氨基酸含量测定: $y = (x - 0.0001) / 0.105$ ($r = 0.9993$)。利用 Excel 软件对分泌物与各部分生

殖器官内容物中各类组分的平均含量进行配对 t 检验,分析结果为:分泌物的蛋白质含量显著高于输卵管内容物,显著低于交配囊内容物;分泌物的还原性糖含量显著低于交配囊内容物中的还原性糖含量;分泌物的游离氨基酸含量显著高于交配囊内容物中氨基酸含量。如果假设分泌物在内生殖系统中只存在于同一个器官中,那么,分泌物中各组成成分的含量应与该器官中各组成成分的含量相一致。上面的测定结果表明:分泌物中蛋白质、还原性糖、游离氨基酸等的含量与受精囊腺内容物相应组分含量均无显著差异,即受精囊腺是产卵分泌物的贮藏器官。

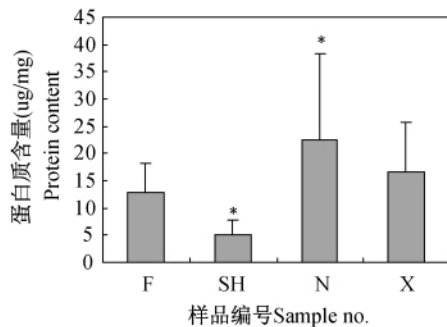


图2 分泌物与各部分内生生殖器官内容物中蛋白质含量比较

Fig.2 Comparison of the protein content of the oviposition secretion and the content of every internal reproductive organs

图中数据为平均值 $\pm$ 标准误,* 表示在 5% 显著水平上各内生生殖器官内容物与分泌物之间的差异 (t -检验);下同。

Data in the figure are mean $\pm$ SE; * indicates that the differences between every internal reproductive organs and the secretion reach significant levels of 0.05 (t -test). The same below.

3 讨论

昆虫种类繁多,产卵方式也各不相同,但产卵分泌物的存在较为普遍,如半翅目、脉翅目、鳞翅目(菜粉蝶 *Pieris rapae* (Linnaeus)、玉米螟 *Pyrausta nubilalis* (Hübner)、二化螟 *Chilo simplex* (Butler)等)、膜翅目、蜉蝣目、蜻蜓目、毛翅目、双翅目的摇蚊科、螳螂目、直翅目蝗虫科、蜚蠊目、啮虫目、水龟虫等的昆虫中,均具有在产卵前、产卵后产生或分泌分泌物的行为习性。只是不同种类昆虫的产卵分泌物存在形式、组成成分、功能和器

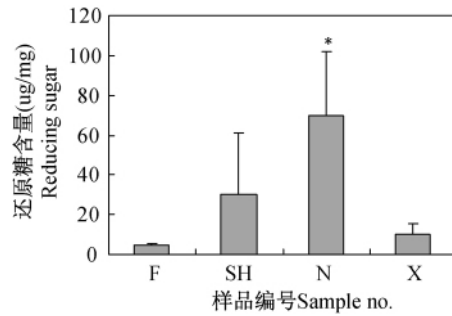


图3 分泌物与各部分内生生殖器官内容物中还原性糖含量比较

Fig.3 Comparison of the reducing sugar content of the oviposition secretion and the content of every internal reproductive organs

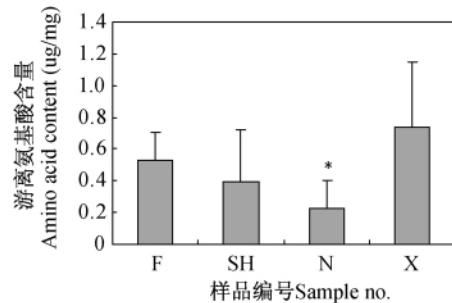


图4 分泌物与各部分内生生殖器官内容物中游离氨基酸含量比较

Fig.4 Comparison of the amino acid content of the oviposition secretion and the content of every internal reproductive organs

官来源有所不同。对鞘翅目的锈色粒肩天牛 *Apriona swainsoni* (Hope)、碎斑簇天牛 *Aristobia voeti* (Thomson)、松墨天牛、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Motschlsky)、云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Hope)、青杨天牛 *Saperda populnea* (Linnaeus)等的产卵习性观察发现,这些天牛与桑天牛相似,也都有产卵后产生分泌物封堵刻槽产卵孔的习性(陆群等,1998; Hisashi and Katsumi, 2000; Peddle *et al.*, 2002; 李树森等, 2002; 蒋芝云等, 2004; 唐成等, 2005; 张永慧等, 2006)。因此,对桑天牛产卵分泌物的研究在昆虫行为学和生态学研究上有一定的理论意义和实践价值,有助于对此类天牛产卵行为的系统了解,并可为有刻槽产卵习性天牛的综合治理提供理论依据。

目前,对昆虫产卵分泌物组成成分器官来源

的研究表明,昆虫雌性附腺是植物表面产卵和卵外具有特殊保护昆虫的产卵分泌物主要来源器官。鳞翅目昆虫产卵时固定卵的胶状分泌物来自雌性附腺,也称粘腺,如家蚕、柞蚕、柳蚕等产卵时均能由粘腺分泌大量胶状黏液蛋白,将卵固定黏附在外物上。除雌性附腺外,卵巢(双翅目的库蚊 *Culex tarsalis*、蚋等、输卵管(榆树叶甲 *Xanthogaleruca luteola* (Müller)、松叶蜂 *Diprion pini* (Linnaeus))、中后肠组织(苹果实蝇 *Rhagoletis pomonella* (Walsh))、第七腹节背板(甘蓝茎象甲 *Ceutorhynchus assimilis* (Payk.))等也是昆虫产卵分泌物中产卵标记信息素的器官来源(Mudd *et al.*, 1997; Meiners and Hilker 2000; 王荫长 2001; 靳远祥等 2005; Schröder *et al.* 2007)。

桑天牛、松墨天牛等具有刻槽产卵习性的昆虫,其产卵分泌物排出体外的时期与植物表面产卵的鳞翅目昆虫明显不同,产卵分泌物是与卵分别排出的,因此,桑天牛类刻槽产卵习性昆虫的产卵分泌物的来源器官也应与植物表面产卵类的昆虫有所不同。上述研究结果也表明,受精囊腺是桑天牛产卵分泌物的主要贮藏器官。Hisashi 和 Katsumi(2001)对松墨天牛雌虫受精囊腺的解剖观察发现,活虫的受精囊腺内含物呈无色或淡黄色透明液体状,而死虫的受精囊腺内含物呈琥珀色透明胶状物,其颜色和性状与刻槽上沉积的产卵分泌物极相似,认为受精囊腺是松墨天牛产卵分泌物的贮藏器官,而且进一步研究雌虫对同种其他个体受精囊腺内含物和产卵分泌物的产卵反应表明,受精囊腺内含物同刻槽上沉积的产卵分泌物一样,含有产卵抑制化合物,再次证明了受精囊腺是产卵分泌物的贮藏器官。其研究结果与本试验结果相同。对松墨天牛的研究还发现,其他生殖器官也对产卵产生抑制作用,表明其他生殖器官可能可以分泌产卵抑制信息素,或者其他生殖器官如受精囊和中输卵管被受精囊腺分泌物污染了。

参考文献 (References)

Dougherty M, Hamilton G, 1997. Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. *J. Chem. Ecol.* 23(12): 2657—2671.

Hisashi A, Katsumi T, 2000. Deterred oviposition response of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) to oviposition scars occupied by eggs. *Agr. Forest. Entomol.* 2(3): 217—223.

Hisashi A, Katsumi T, 2001. Oviposition deterrent by female reproductive gland secretion in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *J. Chem. Ecol.* 27(6): 1151—1161.

蒋芝云, 唐志祥, 邵生富, 蒋惠中, 范汉柱, 2004. 碎斑簇天牛生物学特性初报. 中国森林病虫, (5): 26—27.

金凤, 嵇保中, 刘曙雯, 田铃, 高洁, 2007. 桑天牛雌成虫产卵器解剖和刻槽及产卵习性研究. 林业科学研究, 20(3): 394—398.

靳远祥, 徐孟奎, 陈玉银, 姜永煌, 杜鑫, 2005. 家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析. 蚕业科学, 31(1): 97—99.

李合生, 2000. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高教出版社. 194—203.

李树森, 牛成礼, 张忠清, 顾克锁, 姚玉领, 2002. 锈色粒肩天牛生物学特性及综合防治技术研究. 河北林业科技, (2): 4—5.

陆群, 张玉凤, 张宏世, 1998. 光肩星天牛求偶、交尾及产卵行为的研究. 内蒙古林业科技, (3): 7—9.

Marchini D, Marri L, Rosetto M, Manetti AG, Dallai R, 1997. Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240(3): 657—663.

Meiners T, Hilker M, 2000. Chemical signaling between host plant and egg parasitoid of a Galerine leaf beetle// Chemical and Physiological Ecology Symposium and Poster Session. Brazil: International Congress of Entomology, 20—26.

Mudd A, Ferguson A W, Blight MM, Williams IH, Scubla P, Solinas M, Clark SJ, 1997. Extraction, isolation, and composition of oviposition-deterrent secretion of cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis*. *J. Chem. Ecol.* 23(9): 2227—2240.

Peddle S, Groot P, Smith S, 2002. Oviposition behaviour and response of *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae) to conspecific eggs and larvae. *Agr. Forest. Entomol.* 4(3): 217—222.

Schröder R, Cristescu S M, Harren FJM, Hikler M, 2007. Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion. *J. Exp. Bot.* 58(7): 1835—1842.

唐成, 潘武全, 龙万辉, 潘攀, 2005. 德阳市杨树云斑天牛发生情况及防治措施. 四川林业科技, 26(6): 62—64.

王荫长, 2001. 昆虫生物化学. 北京: 中国农业出版社. 376—395.

文树基, 1994. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社. 53—190.

张龙翔, 2003. 生化实验方法和技术(第二版). 北京: 高教出版社. 134—140.

张永慧, 郝德君, 王焱, 戴华国, 2006. 松墨天牛成虫交配与产卵行为的观察. 昆虫知识, 43(1): 47—50.