中的极性物质和非极性物质对防控玉米象可能均具有颇大潜力，亟需进一步研究各主要成分对玉米象及其他主要储粮害虫的活性作用，深入研究其作用机制，为研发储粮害虫防护剂提供参考依据。

参考文献(References)

Denloye AA, Ajelarai OK, Olowu RA, Eshilokun AO, Makanjuola WA, 2009. Insecticidal activity of petroleum ether extract and essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 52 (8):923—928.

李兵，魏辉，黄建，黄玉清，占志雄，2006. 土荆芥精油的超临界 CO_2 萃取条件及杀虫活性的初步研究. 华东昆虫学报，15 (4):305—308.

聂勋才，2008. 土荆芥的研究进展. 光明中医，23 (10):1635—1637.

孙红霞，魏辉，赵建伟，吴珍泉，占志雄，2008. 土荆芥精油预处理后小菜蛾幼虫对氟虫腈敏感度的变化. 华东昆虫学报，17 (1):9—13.

Tapondjou LA, Adler C, Bouda H, Fontem DA, 2002. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *J. Stored Prod. Res.*, 38:395—402.

王锦鸿，陈仁寿，2003. 临床实用中药辞典. 北京：金盾出版社. 40—41.

姚英娟，杨长举，薛东，2006. 石菖蒲提取物对玉米象的驱避和触杀作用. 华中农业大学学报，25(6):614—617.

易平炎，李会新，魏木山，边滔，杨长举，杨志慧，华红霞，胡建芳，2000. 饲料害虫的发生规律及防治. 粮食储藏，9 (1):20—26.

赵建伟，魏辉，赵士熙，吴玮，占志雄，2007. 土荆芥生物总碱对家蝇的毒杀作用及药剂敏感性的影响. 华东昆虫学报，16 (1):64—69.

中国药科大学等编，1993. 中药辞海. 北京：中国医药科技出版社. 232.

斑蝥素对小菜蛾体壁组织结构的影响*

陈利平** 杨宝东 张志勇*** 张爱环 张民照 张来喜 孙淑玲
(北京农学院植物科技学院 北京 102206)

摘 要 为探究昆虫天然产物斑蝥素(cantharitin,CTD)对鳞翅目昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)的触杀机制,利用透射电子显微镜观察了该物质处理小菜蛾4龄幼虫体壁组织结构的变化。斑蝥素亚致死剂量0.15 μg/头和半致死剂量0.3 μg/头点滴处理试虫前胸背板,中毒试虫反映结果类似。处理12 h后中毒试虫虫体发黑,陆续死亡。处理12 h后,体壁细胞细胞核固缩并且边极化,线粒体扭曲,内脊模糊出现空泡化,线粒体和粗面内质网数量下降;处理24 h后,体壁细胞出现的类似处理12 h后的症状,且症状更为明显。结果表明CTD对小菜蛾体壁表皮层组织结构无显著破坏作用,但对体壁细胞有明显的致毒作用。

关键词 体壁组织,斑蝥素,触杀作用

Effect of cantharidin on the integument structure of *Plutella xylostella*

CHEN Li-Ping** YANG Bao-Dong ZHANG Zhi-Yong***
ZHANG Ai-Huan ZHANG Min-Zhao ZHANG Lai-Xi SUN Shu-Ling
(School of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract To investigate the contact toxicity of the natural insect product cantharidin ($C_{10}H_{12}O_4$, CTD) against a Lepidopteran insect, the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.), transmission electron microscope (TEM) images of *P. xylostella* larvae were observed at different times after treatment with CTD. Exposure to a sublethal dose of 0.15 μg/larva and a medial lethal dose of 0.3 μg/larva for 12 h and 24 h by topical application to the pronotum gave similar results; larvaes' bodies became dark and they died 12 h after treatment. TEM images of the epidermal cells of treated larvae showed that cell nuclei had aggregated, mitochondria had become distorted with mitochondrial cristae and the mitochondria had become blurred and vacuolizated. The quantity of mitochondria and rough endoplasmic reticulum (RER) declined 12 h after CTD treatment. These phenomena were also evident 24 h after CTD treatment. These results indicate that CTD did not destroy the cuticle layers but damaged epidermal cells in the insects' integument.

Key words integument structure, cantharidin, contact toxicity

斑蝥素(cantharidin, CTD)是昆虫在进化中形成的一种倍半萜类防御物质,广泛存在于芫菁类昆虫体内。斑蝥素对其他生物的活性作用最早在传统中医药实践中被发现,早在公元前一、二世纪的《神农本草》中已有记述。经过2 100余年的临床实践,其药用价值在于其外用能蚀死肌、敷疥癣、除恶疮,内服有攻毒、逐阙散结、抗肿瘤等作用(中国药典编委会,2005)。在医学应用方面,斑蝥素能治疗病毒性慢性乙型肝炎、白血病、狂犬病、皮肤病毒、真菌;同时还具有壮阳、升高白细胞等疗效(谭娟杰等,1995;陆文光,1996)。欧洲曾常使用斑蝥素做堕胎剂和起泡剂(Moed *et al.*, 2001)。同时随着社会经济的发展,对农药环境安全性的要求愈来愈高,天然产物的植物保护价值

* 资助项目:国家自然科学基金(30971938)、北京市科技计划(Z09060500600906)、北京市教委科技创新平台(PXM2008014207055164)、北京市教委科技创新团队(PHR201107135)支持。

**E-mail:chenliping6666@163.com
***通讯作者,E-mail:zhangzy16@yahoo.com.cn

收稿日期:2011-03-17,接受日期:2011-09-13

逐渐成为研究热点,在植保应用方面,斑蝥素的杀虫抑菌等作用也不断受到关注。已经证明,斑蝥素具有杀虫(张志勇等,1998;魏列新等,2007;李晓飞等,2008)、抑菌(云月利和徐冠军,2003;曹微丹,2008)、诱集昆虫(Snead and Alcock,1985;Eisner *et al.*,1996)、除草(Masafuni *et al.*, 1987)等作用,并且已有农药产品上市(陈琳和顾明洁,2002)。在杀虫作用方面,Carrel 和 Eisner(1974)发现亚毫克浓度的斑蝥素饲喂可对蚂蚁、步甲等产生明显的拒食作用。张志勇等(2000)已经证实斑蝥素杀虫作用方式不仅具有胃毒、拒食 2 种,而且还具有较强的触杀和内吸作用,试虫中毒后活动能力下降,缓慢趋于死亡,表明斑斑蝥素具有"软性"杀虫剂的特点。在杀虫机理方面,斑蝥素饲喂粘虫 *Leucania separata* (Walker) 6 龄幼虫后,中毒试虫的神经节内神经纤维集结成块、断裂、膨胀、解体,中肠肠壁细胞脱落(卢宝廉,1964)。近年来,张雅林等(2003)报道斑蝥素饲喂后小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)幼虫中肠柱状细胞微绒毛脱落,杯状细胞变大,质膜消失;线粒体不规则肿胀,内嵴排列紊乱、溶解、断裂;粗面内质网扩张明显,核糖体脱落, 细胞核肿胀, 染色质浓缩,偏移。马燕等(2010)报道斑蝥素饲喂可明显抑制碱性磷酸酯酶;离体活体条件下均可显著抑制多酚氧化酶活性。触杀作用是斑蝥素对昆虫致毒作用的重要方式,但有关其触杀作用机制研究未见报道。本文利用电镜技术,观察斑蝥素亚致死剂量和半致死剂量作用于小菜蛾幼虫体壁组织的显微结构变化,以期为进一步研究斑蝥素对昆虫的触杀机理提供直观的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

斑蝥素(CTD,纯度大于 96%,由北京农学院植保教研室提供),用丙酮溶解斑蝥素配成 500 μg/mL 和 1 000 μg/mL 液,现配现用。丙酮、乙醇、乙醚等均为分析纯,市购。

试虫:小菜蛾种群于 2003 年采自北京郊区,以出芽 3 d 的萝卜苗室内连续无农药饲养 50 代以上。饲养条件恒温 25℃、光照 L∶D = 16∶8。

电子透射显微镜(New Bio-TEM H-7500),超薄切片机(Leica EM UC6)等,由中国农业科学院原子能研究所提供。

1.2 方法

试验分 3 个处理组,即空白对照组和 2 个药剂处理组,选 4 龄幼虫作为试验用虫,平均体重为 47.8 mg,每组处理试虫 10 头,点滴试虫 500 μg/mL 或 1 000 μg/mL CTD 药液 0.3 μL,即剂量为 0.15 μg/头和 0.30 μg/头,CTD 终浓度为 31.38 μg/g 和 62.76 μg/g。试虫先用乙醚麻醉,再用微量注射器将设计浓度的药液滴于前胸背板,处理后分别饲养,观察试虫中毒症状。分别在药剂处理后 12 h 和 24 h 后取典型中毒症状的试虫 3 头,在解剖镜下分离出前胸背板,于洁净玻璃皿中用新刀片切成约 1 mm^3 大小,预冷的 2.5% 戊二醛 4℃固定过夜,常温固定 24 h,送样至中国农业科学院原子能研究所电镜室,生理盐水漂洗,1% 锇酸后固定,0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗,1% 醋酸铀块染,0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗,梯度脱水,浸蜡,包埋聚合,修块,超薄机切片,醋酸铀 - 柠檬酸铅染色等常规程序,于电子显微镜下观察其细胞显微结构,拍片。

2 结果与分析

CTD 处理试虫后,除了个别试虫有明显应激反应外,活动能力很快下降。药剂处理 1 h 后,试虫爬行活动逐渐减少,12 h 后活动逐渐停止,部分试虫进入瘫痪状态。中毒试虫滴药处开始呈现暗褐色,之后呈现黑棕色,肛门有少量绿黄色粘液分泌,24 h 后逐渐死亡。

2.1 CTD 点滴小菜蛾体壁对其表皮层的影响

CTD 点滴触杀小菜蛾幼虫前胸背板后的超微结构显示,亚致死剂量(0.15 μg/头)组和半致死剂量组(0.30 μg/头)试虫表皮层结构与对照组相比均未见明显的变化。试虫体壁结构整齐、分层清晰;表皮层与皮细胞层的界限分明。以半致死剂量组(0.30 μg/头)为例可以看出,内表皮质地均匀一致,上表皮组成未见异常,非细胞性疣状外突可见(图 1:A ~ D,a 箭头指示)。观察结果表明,CTD 能较快地穿透昆虫体壁隔层直达皮细胞。但在体壁局部,可见外表皮层微管中脂类积累物质明显向四周扩散渗透,表明较多的 CTD 溶液在经外表皮微管中向体壁内侧扩散时受到了内表皮的阻滞,CTD 溶液在外表皮微管中滞留导致了其中沉积的脂类物质向周围渗透(图 1:D,b 箭头所

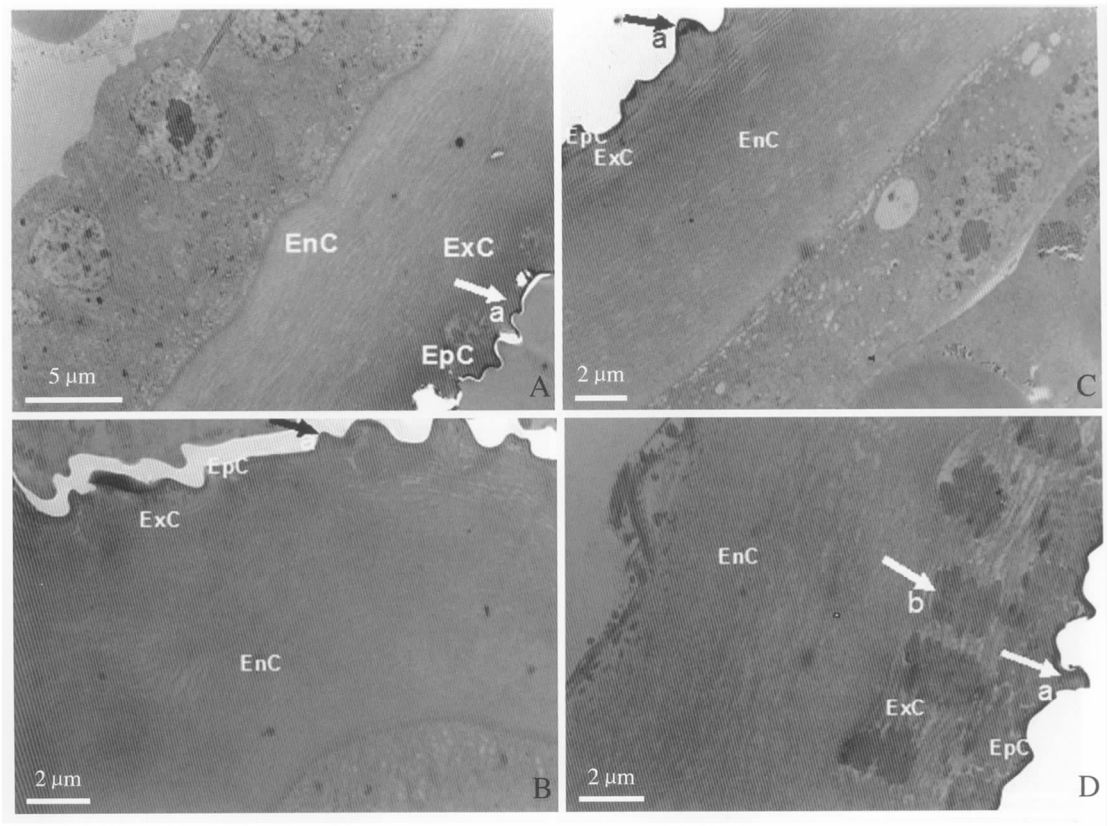

图 1　CTD 点滴小菜蛾后体壁表皮层显微结构

Fig. 1　Epidermics microstructure of diamondback moth after treated with CTD

A:12 h 的对照组;B:0.3 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:24 h 对照组;D:0.3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

EpC:上表皮; ExC:外表皮; EnC:内表皮。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 12 h;C:CK in 24 h;D:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 24 h.

EpC:Epicuticula; ExC:Exocuticula;EnC:Endocuticula.

指示)。

2.2　CTD 点滴小菜蛾体壁对其皮细胞的影响

超微结构显示,空白对照组皮细胞结构完整,细胞核分布均匀,细胞器清晰可见,边界分明(图 2:A,D)。CTD 亚致死剂量和半致死剂量处理,同一时间组中毒试虫体壁细胞变化结果基本一致。12 h 药剂处理组的皮细胞外形完整,细胞膜未见异常,细胞核固缩并且边极化,表现出凋亡特征(图 2:B,C)。CTD 处理 24 h 后,与 12 h 相似,皮细胞发生核固缩并边极化(图 2:E,F),都有细胞核膜褶皱,如图 2 箭头(a)所示,但都未见到明显的凋亡小体,凋亡处于早期阶段。

2.3　CTD 点滴小菜蛾体壁对皮细胞中线粒体的影响

点滴小菜蛾幼虫前胸背板的超微结构显示,12 ,24 h 后,对照组中皮细胞线粒体呈椭圆形和圆形,内嵴清晰可见,线粒体数量较多(图 3:A,D)。同一时间处理的亚致死剂量组和半致死剂量组之间中毒试虫体壁细胞变化结果没有明显差异。但是随着时间的延长,体壁细胞线粒体结构损坏程度明显增大。电镜照片可见,处理组中 12 h 后皮细胞线粒体结构完整,部分线粒体扁圆形或扭曲(图 3:B,C),内嵴模糊,出现空泡化(图 3:E),内嵴结构损坏(图 3:B,C,E,F);处理组中 24 h 后,皮细胞线粒体几乎只剩空壳,或者全部解体。

2.4　CTD 点滴小菜蛾体壁对皮细胞中其它细胞器的影响

分析电镜观察结果可见,CTD 处理对试虫体壁细胞内质网结构影响较大,但对高尔基体影响不大。在较低剂量下(0.15 μg/头), CTD 处理 12

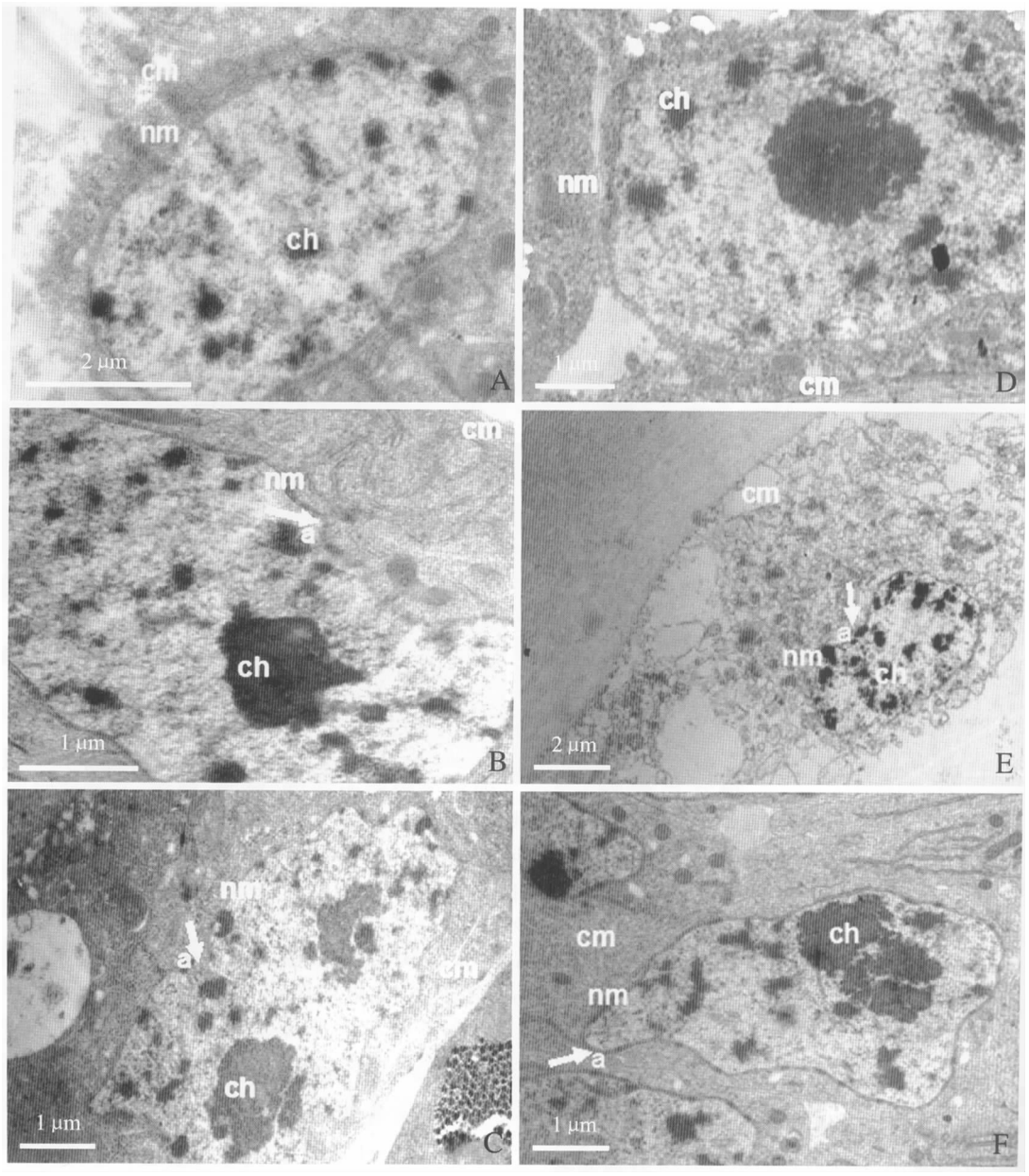

图 2　CTD 点滴小菜蛾体壁后皮细胞显微结构

Fig. 2　Microstructure of epidermis cells in diamondback moth after treated with CTD

A:空白组 12 h; B:0.15 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:0.3 μg/头 CTD 处理 12 h 组; D:空白组 24 h;E:0.15 μg/头 CTD 处理 24 h 组;F:0.3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

cm:细胞膜;nm:细胞核膜;ch:染色质。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0.15 μg/individual in 12 h; C:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 12 h; D:CK in 24 h; E:Treated with CTD 0.15 μg/individual in 24 h; F:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 24 h.

cm:Cell membrane; nm:Nuclear membrane; ch:Chromatin.

h 后试虫体壁细胞中内质网上的核糖体数量与对照组比即有明显下降(图 4:A,B);在较高剂量(0.3 μg/头)中毒较长时间(处理 24 h)时,体壁细胞中的高尔基体结构完整,与对照组无差异(图 4:C,D)。由此可见 CTD 触杀小菜蛾破坏了细胞中合成蛋白质的核糖体,并未对蛋白质加工和转运的高尔基体造成较大影响。随着 CTD 处理时间和浓度的增加,皮细胞溶解坏死。

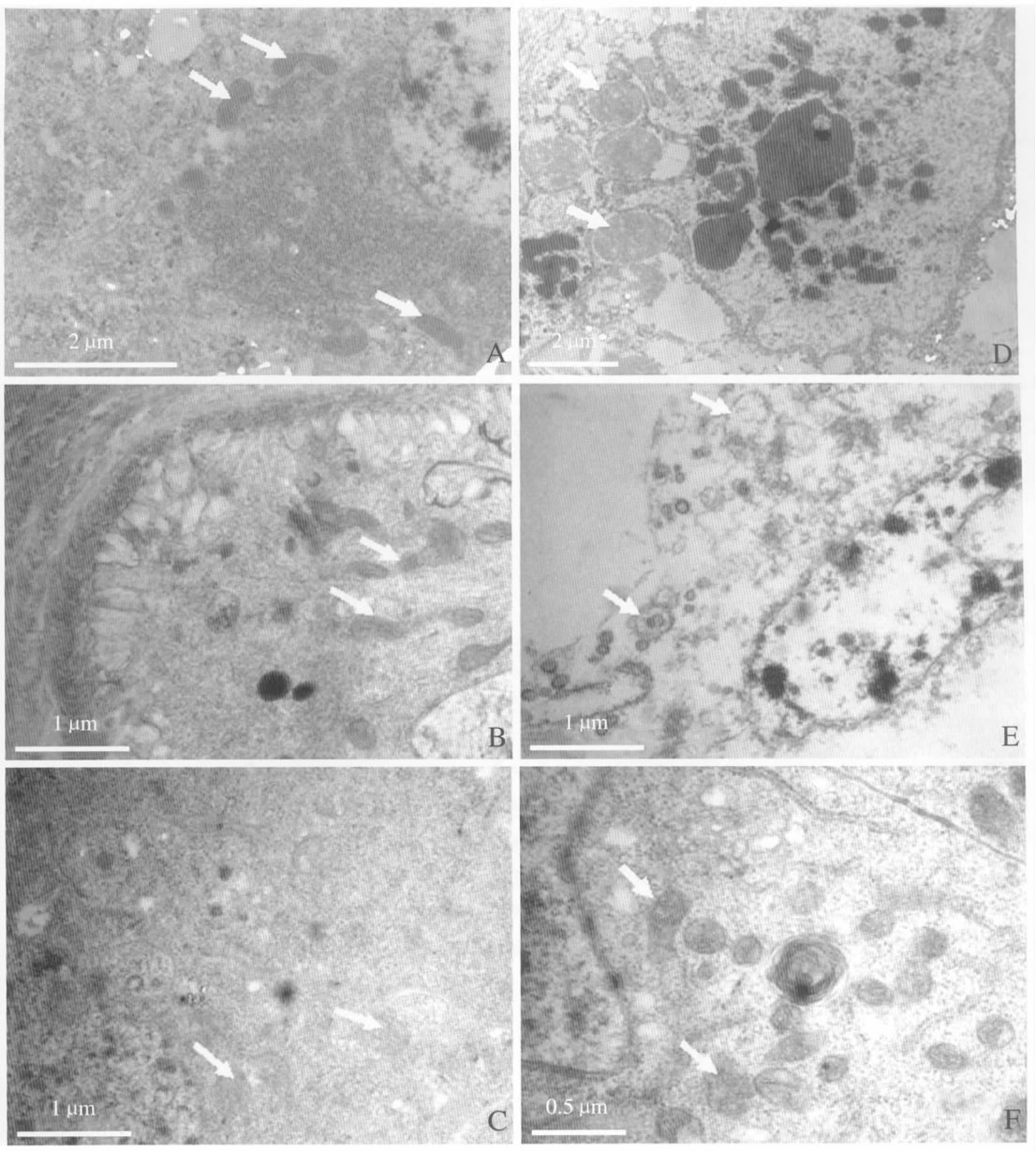

图 3　CTD 点滴小菜蛾体壁后皮细胞线粒体的显微结构

Fig. 3　Mmicrostructure of mitochondrions in epidermis cells of diamondback moth after treated with CTD

A:空白组 12 h; B:0. 15 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:0. 3 μg/头 CTD 处理 12 h 组; D:空白组 24 h; E:0. 15 μg/头 CTD 处理 24 h 组;F:0. 3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0. 15 μg/individual in 12 h; C:Treated with CTD 0. 3 μg/individual in 12 h; D:CK in 24 h; E:Treated with CTD 0. 15 μg/individual in 24 h; F:Treated with CTD 0. 3 μg/individual in 24 h.

综上可见,斑蝥素点滴处理小菜蛾,对试虫体壁表皮层影响不大,而其作用部位是皮细胞。斑蝥素通过表皮层和细胞膜,导致皮细胞内亚细胞结构的破坏。试虫死亡和体壁细胞线粒体结构受损、功能丧失有关,也与体壁细胞内质网结构受损,蛋白质合成受阻有关。

3　讨论

本研究中 CTD 处理试虫后,药剂处理 1 h 后,试虫爬行活动逐渐减少,12 h 后活动逐渐停止,部分试虫进入瘫痪状态。中毒试虫滴药处开始呈现暗褐色,之后呈现黑棕色,CTD 触杀的毒性主要表

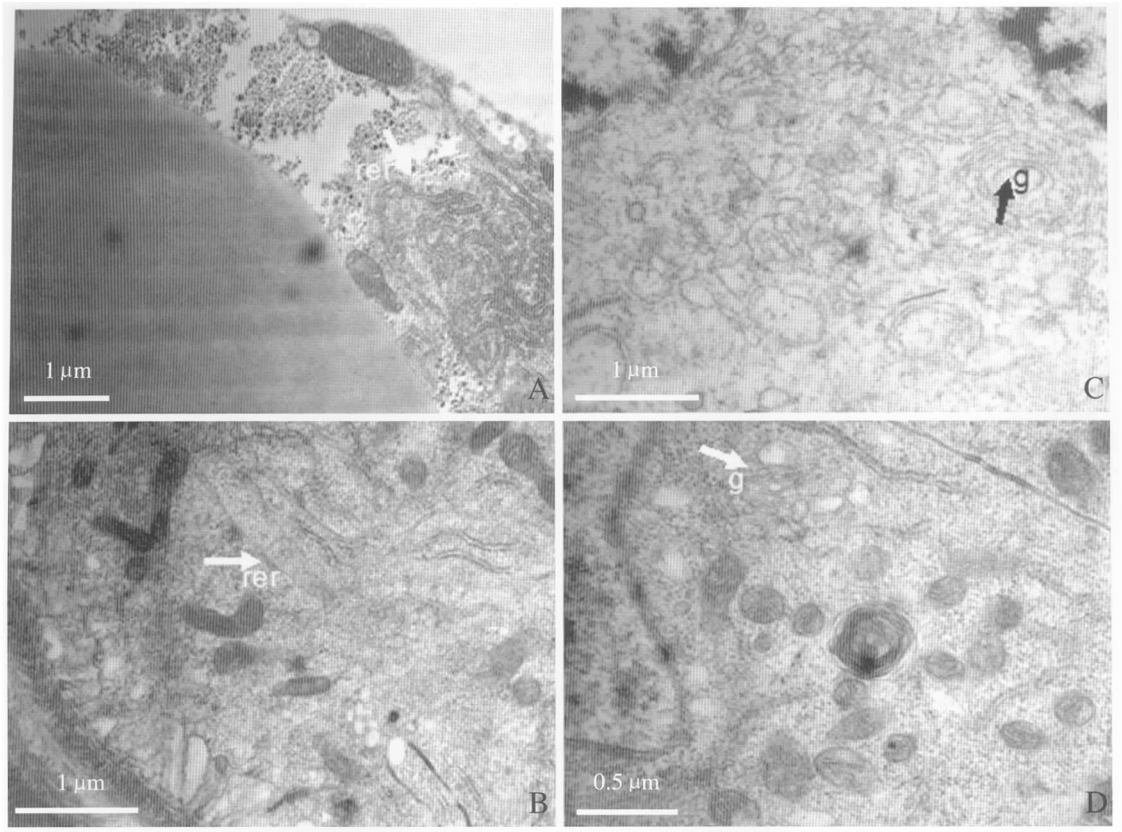

图 4　CTD 点滴小菜蛾体壁后皮细胞其它细胞器的显微结构

Fig. 4　Microstructure of other organs in epidermis cells of diamondback moth after treated with CTD

A:空白组 12 h; B:0. 15 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:空白组 24 h; D:0. 3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

rer:粗面内质网;g :高尔基体。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0. 15 μg/individual in 12 h; C:CK in 24 h; D:Treated with CTD 0. 3μg/individual in 24 h.

rer:Rough endocytoplasmic reticulum; g:Golgi apparatus.

现为昆虫外部行为形态的变化,同时肛门有少量绿黄色粘液分泌,24 h 后逐渐死亡。这些症状与胃毒中毒症状相似(张志勇等,1998),说明斑蝥素对小菜蛾触杀致毒后中毒试虫具有与胃毒中毒类似的解毒生理反应。

前人在研究斑蝥素的抗癌功能时提出,斑蝥素对癌细胞的抑制作用是通过抑制癌细胞线粒体的能量系统(Wang *et al.* , 2000)而引起的,本研究直接证明了斑蝥素对昆虫细胞具有同样的致毒机理。斑蝥素触杀小菜蛾后试虫体壁表皮组织结构虽然变化不大,但体壁细胞线粒体形态异常,数量下降。线粒体是细胞的"动力工厂",为细胞的各种需能过程提供 ATP。昆虫细胞在斑蝥素作用下,线粒体内嵴模糊,内部空泡化,表明线粒体结构出现了病变,其结果是细胞呼吸链及 ATP 能量供源中断,导致细胞一系列生命耗能活动受到抑制而死亡。

前人还报道斑蝥素能抑制丝氨酸/ 苏氨酸蛋白磷酸酶 1 型和 2A 型的活性(Honkanen,1993),并且是丝氨酸/ 苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 型(PP2A)的特异性抑制剂(Li and Casida, 1992),斑蝥素也可通过抑制蛋白磷酸酶活性而改变肿瘤血管内皮细胞通透性(Knapp *et al.* , 2000)。在本研究中观察到斑蝥素处理后小菜蛾体壁细胞中的内质网上的核糖体数量明显下降,高尔基体结构变化不明显,表明斑蝥素的触杀作用机理还在于抑制了试虫体壁细胞的蛋白质合成,但斑蝥素抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 1 型和 2A 型的活性是否与这些酶的合成抑制有关,还需进一步证实。此外,试虫斑蝥素触杀中毒后呈现的脱水症状是否与斑蝥素改变试虫体壁细胞透性而导致细胞液渗出有关,也值得进一步研究。

参考文献(References)

Carrel JE, Eisner T, 1974. Cantrharidin: potent feeding deterrent to insects. *Science*, 183(4126):755—757.

陈琳,顾明洁,2002. 生物农药 0.1% 斑蝥素水剂的田间应用研究. 农药科学与管理,23(4):32—34.

曹微丹,张志勇,杨宝东,张民照,孙淑玲,2008. 斑蝥素及去甲斑蝥素对七种植物病原真菌的抑制作用. 植物保护学报,35(1):63—68.

Eisner T, Smedley SR, Young DK, Eisner M, Roach B, Meinwald J, 1996. Chemical basis of courtship in a beetle (Neopyrochroaflabellate): cantharidin as "nuptial gift". *PNAS*,93(13):6499—6503.

Honkanen RE, 1993. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/ threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.*, 330(3):283—286.

Knapp J, Bokník P, Lüss I, Huke S, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Nacke P, Noll T, Piper HM, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J, 2000. The protein phosthatase inhibitor cantharidin alters vascular endothelial cell permeability. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 289(3):1480—1486.

Li YM, Casida JE, 1992. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *PNAS*, 89(24): 11867—11870.

卢宝廉,1964. 斑蝥素中毒后粘虫的组织病理学变化. 昆虫学报,13(6):824—834.

陆文光, 1996. 评斑蝥的药用价值. 中国民族医药杂志,(2):58.

李晓飞,陈祥盛,侯晓晖,2008. 斑蝥素对 6 种害虫的毒杀作用. 贵州农业科学, 36 (3):65—66.

马燕,刘瑞瑞,马志卿,张雅林,2010. 斑蝥素对粘虫几种代谢酶及多酚氧化酶的影响. 昆虫学报,53(8):870—875.

Masafuni M, Michael JG, John EC, 1987. Endothal and cantharidin analogues: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. *Agric. Food Chem.*, 35(5):823—829.

Moed L, Shwayder TA, Chang MW, 2001. Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. *Arch. Dermatol.*, 137(10):1357—1360.

Snead JS, Alcock J, 1985. Aggregation formation and assortative mating in two Meloid beetles. *Evolution*, 39(5): 1123—1131.

谭娟杰, 章有为, 王书永, 邓正己, 朱传先, 1995. 中国药用甲虫芫菁科的资源考察与利用. 昆虫学报, 38(3): 324—331.

Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, Yena KY, Yang LL, 2000. Cytoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology*, 147 (2):77—87.

魏列新,梁巧兰,沈慧敏,杨顺义,2007. 1.5% 斑蝥素 AS 对粘虫的生物活性. 农药,46(4):272—273.

云月利,徐冠军,2003. 斑蝥素对植物病原菌抑制作用的研究. 湖北大学学报(自然科学版),25(4):342—345.

张雅林,周越,张志勇,2003. 斑蝥素对粘虫和小菜蛾幼虫中肠组织的影响. 昆虫学报,46(3):272—276.

张志勇,袁峰,张兴,2000. 斑蝥素对菜蛾消化酶及酯酶的影响. 植物保护学报,27(4):355—358.

张志勇,袁锋,张兴,李朝红,1998. 斑蝥素对菜蛾的毒杀作用初报. 植物保护学报,25(2):166—170.

中国药典组委会,2005,中华人民共和国药典. 第一部. 北京:化学工业出版社. 1—253.

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 5 h 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-Jing[1] CHEN Wen-Long[1**] WEI Wei[2]

(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,以幼虫咀食叶片为害,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除技术研究与推广(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。

鳞翅目雌蛾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 ± 1)℃,光照周期 L: D = 14: 10,相对湿度 75% ± 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 5 h 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 3 h 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 10 min,100% 乙醇脱水 10 min × 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 3 h 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 2 h,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 10 min,100% 丙酮脱水 10 min × 2 次),经包埋、切片、染色后,最后用日立 H-7650 透视电镜观察并拍照。

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)。

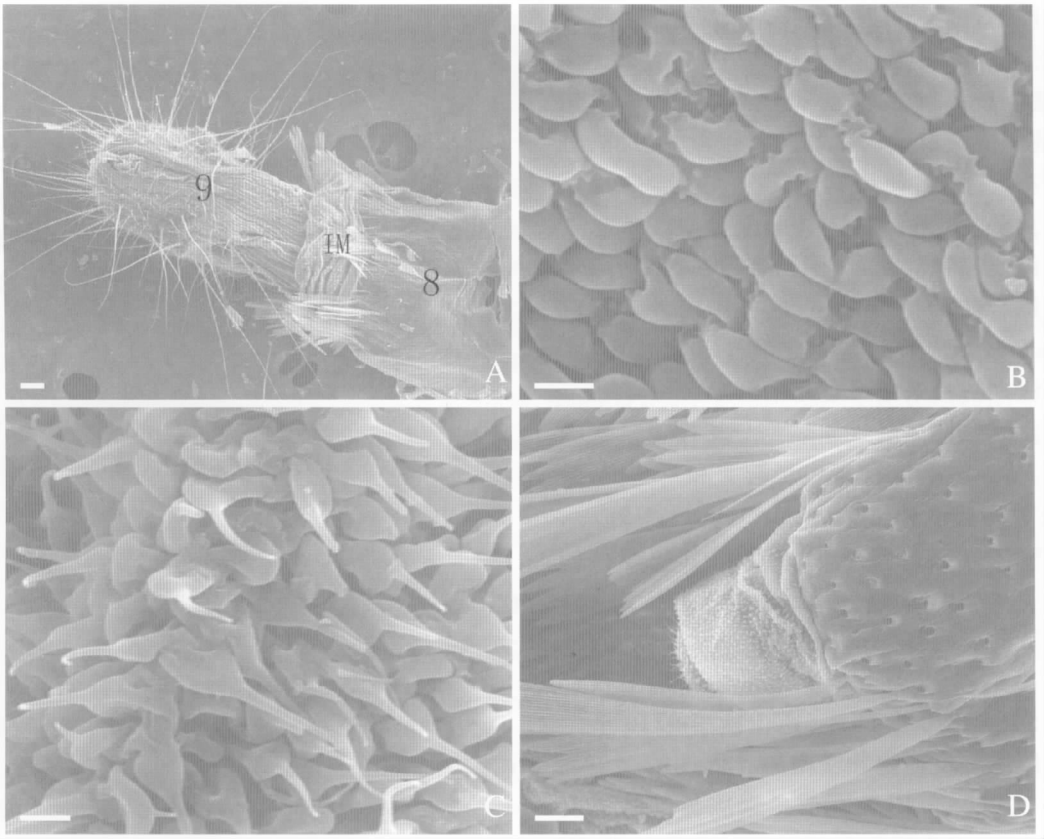

图 1 3 日龄茶银尺蠖雌蛾腹部末端扫描电镜结果

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 microtrichae of the IM; C:位于节间膜上基部膨大的长刺状突起 Spiny microtrichae with enlarged base of the IM; D:2 种突起的着生位置 The position of tow kinds of microtrichae. 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血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

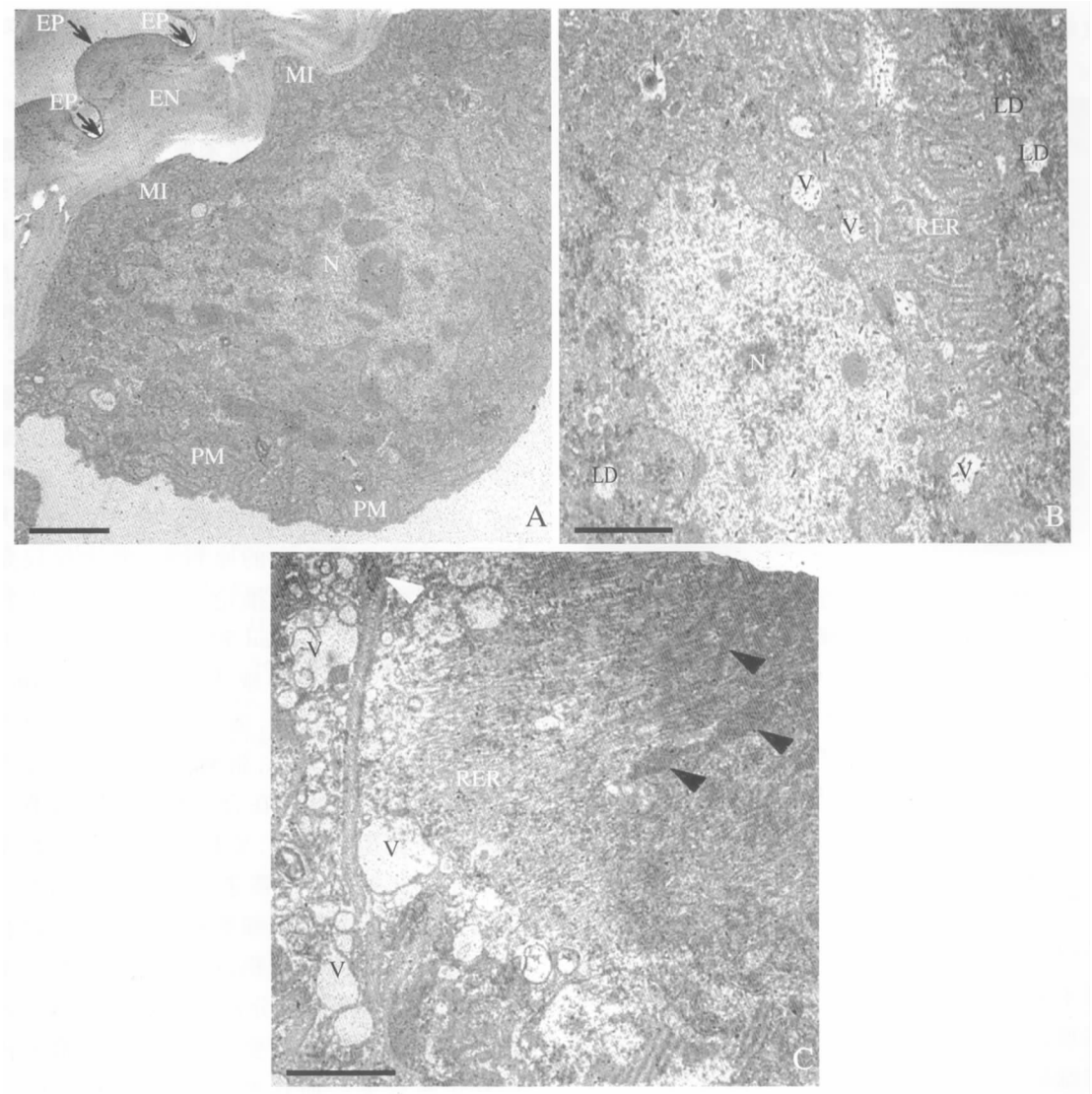

图2　成熟雌蛾(3日龄)性腺细胞的透射电镜观察

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 μm.

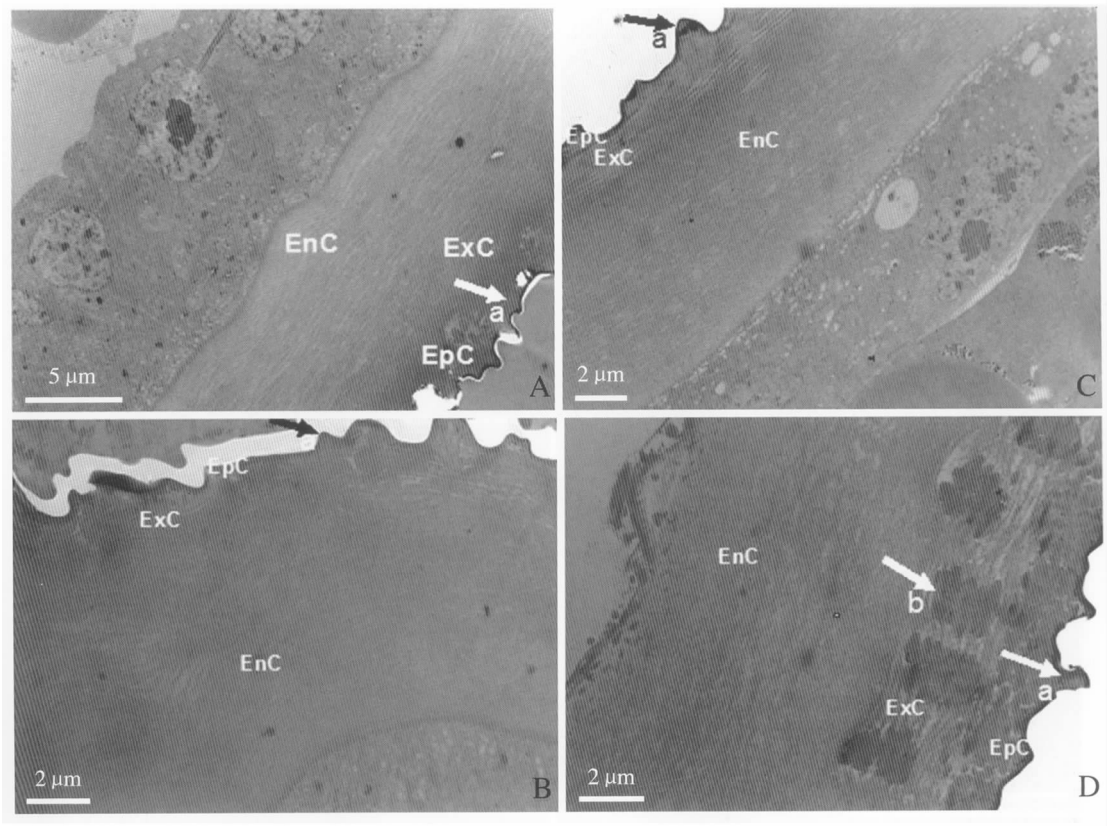

图 1　CTD 点滴小菜蛾后体壁表皮层显微结构

Fig. 1　Epidermics microstructure of diamondback moth after treated with CTD

A:12 h 的对照组;B:0.3 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:24 h 对照组;D:0.3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

EpC:上表皮; ExC:外表皮; EnC:内表皮。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 12 h;C:CK in 24 h;D:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 24 h.

EpC:Epicuticula; ExC:Exocuticula;EnC:Endocuticula.

指示)。

2.2　CTD 点滴小菜蛾体壁对其皮细胞的影响

超微结构显示,空白对照组皮细胞结构完整,细胞核分布均匀,细胞器清晰可见,边界分明(图 2:A,D)。CTD 亚致死剂量和半致死剂量处理,同一时间组中毒试虫体壁细胞变化结果基本一致。12 h 药剂处理组的皮细胞外形完整,细胞膜未见异常,细胞核固缩并且边极化,表现出凋亡特征(图 2:B,C)。CTD 处理 24 h 后,与 12 h 相似,皮细胞发生核固缩并边极化(图 2:E,F),都有细胞核膜褶皱,如图 2 箭头(a)所示,但都未见到明显的凋亡小体,凋亡处于早期阶段。

2.3　CTD 点滴小菜蛾体壁对皮细胞中线粒体的影响

点滴小菜蛾幼虫前胸背板的超微结构显示,12 ,24 h 后,对照组中皮细胞线粒体呈椭圆形和圆形,内嵴清晰可见,线粒体数量较多(图 3:A,D)。同一时间处理的亚致死剂量组和半致死剂量组之间中毒试虫体壁细胞变化结果没有明显差异。但是随着时间的延长,体壁细胞线粒体结构损坏程度明显增大。电镜照片可见,处理组中 12 h 后皮细胞线粒体结构完整,部分线粒体扁圆形或扭曲(图 3:B,C),内嵴模糊,出现空泡化(图 3:E),内嵴结构损坏(图 3:B,C,E,F);处理组中 24 h 后,皮细胞线粒体几乎只剩空壳,或者全部解体。

2.4　CTD 点滴小菜蛾体壁对皮细胞中其它细胞器的影响

分析电镜观察结果可见,CTD 处理对试虫体壁细胞内质网结构影响较大,但对高尔基体影响不大。在较低剂量下(0.15 μg/头), CTD 处理 12

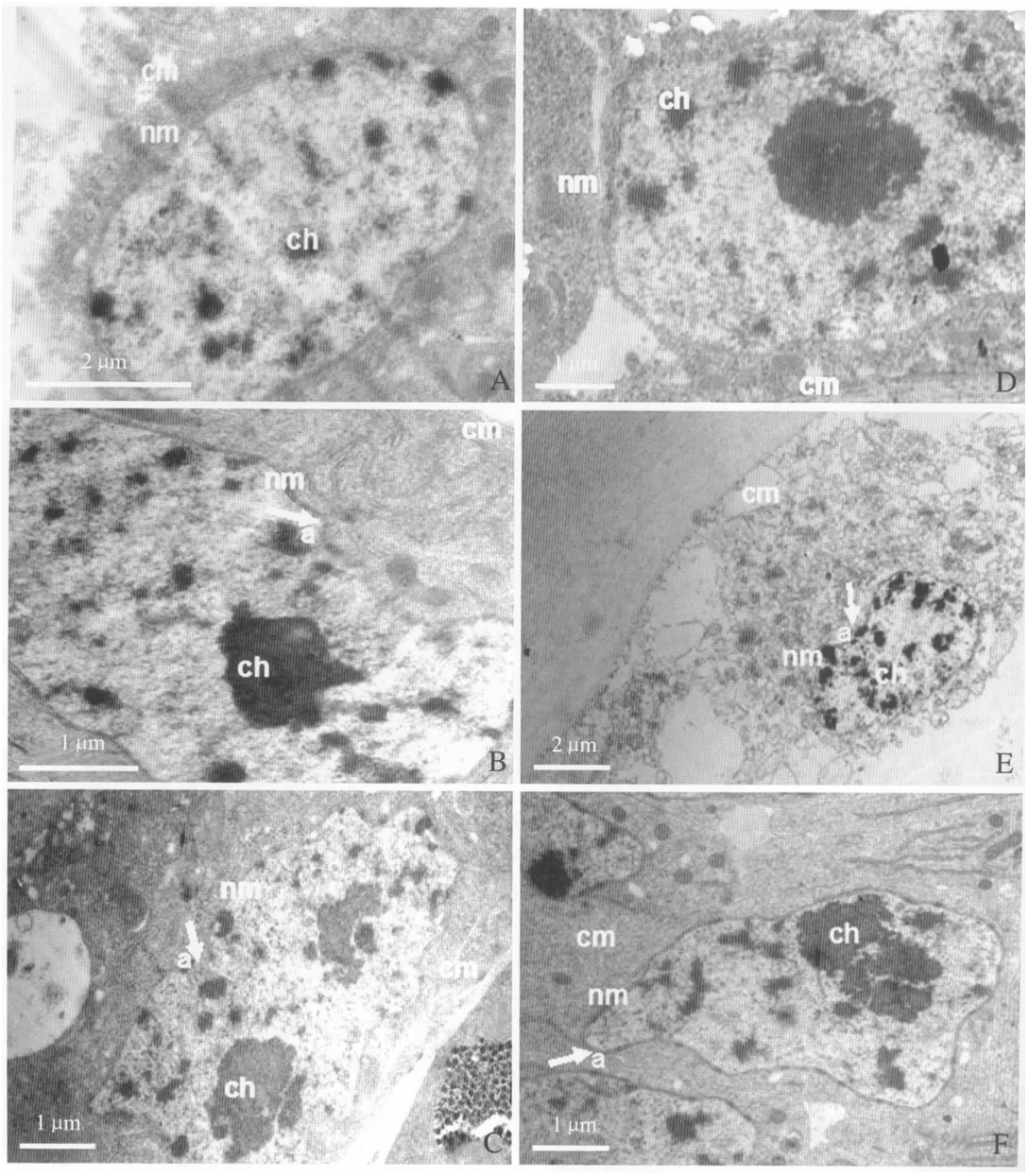

图 2　CTD 点滴小菜蛾体壁后皮细胞显微结构

Fig. 2　Microstructure of epidermis cells in diamondback moth after treated with CTD

A:空白组 12 h; B:0.15 μg/头 CTD 处理 12 h 组;C:0.3 μg/头 CTD 处理 12 h 组; D:空白组 24 h;E:0.15 μg/头 CTD 处理 24 h 组;F:0.3 μg/头 CTD 处理 24 h 组。

cm:细胞膜;nm:细胞核膜;ch:染色质。

A:CK in 12 h; B:Treated with CTD 0.15 μg/individual in 12 h; C:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 12 h; D:CK in 24 h; E:Treated with CTD 0.15 μg/individual in 24 h; F:Treated with CTD 0.3 μg/individual in 24 h.

cm:Cell membrane; nm:Nuclear membrane; ch:Chromatin.

h 后试虫体壁细胞中内质网上的核糖体数量与对照组比即有明显下降(图 4:A,B);在较高剂量(0.3 μg/头)中毒较长时间(处理 24 h)时,体壁细胞中的高尔基体结构完整,与对照组无差异(图 4:C,D)。由此可见 CTD 触杀小菜蛾破坏了细胞中合成蛋白质的核糖体,并未对蛋白质加工和转运的高尔基体造成较大影响。随着 CTD 处理时间和浓度的增加,皮细胞溶解坏死。