

染料标记对二化螟生长发育的影响*

戴长庚** 张昌容 李鸿波 胡 阳***

(贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘 要 【目的】本研究主要目的是通过染色饲料饲喂获得标记的二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 成虫, 且不影响其生理和行为, 为二化螟成虫的扩散和运动行为提供一种标记方法。【方法】笔者所在实验室前期筛选出一个适合二化螟染料及浓度, 通过连续 3 代饲养观察染色剂对二化螟标记效果及生长发育的影响。【结果】连续 3 代的幼虫期饲喂含 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度的苏丹红 7B 人工饲料后, 幼虫、成虫及卵均可被染色, 饲喂染色饲料后, 其化蛹率、羽化率、成虫产卵量、寿命和卵孵化率与对照均没有显著差异。取食染色饲料的二化螟雌、雄平均蛹重比对照分别高 5.3 mg 和 4.2 mg, 雌、雄平均幼虫+蛹历期比对照延长 2.8 d 和 2.3 d。【结论】该标记技术对二化螟没有明显的生物学影响, 操作简便且经济可行, 是一种较好的大规模标记二化螟的方法。

关键词 二化螟, 生长发育, 苏丹红, 染色标记, 人工饲料

Effects of oil-soluble dyes on the growth and development of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Cramidae)

DAI Chang-Geng** ZHANG Chang-Rong LI Hong-Bo HU Yang****

(Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract 【Objectives】To develop a diet that can mark *Chilo suppressalis* without significant adverse effects. The ability to mark individual insects would be useful for studying behaviors such as adult dispersal, mate choice and food preferences. 【Methods】 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Sudan Red 7B was incorporated into an artificial diet fed to *C. suppressalis* larvae and biological parameters of marked individuals were recorded and compared to those of a control group fed the same artificial diet without Sudan Red 7B. 【Results】The diet containing Sudan Red 7B effectively marked eggs, larvae, and adults, and the pupation rate, emergence rate, fecundity, egg hatching rate and adult longevity of the Sudan Red (SR) treatment group were similar to those of the control. Interestingly, the pupal weights of SR females and males were respectively 5.3 mg and 4.2 mg higher than those of their control group counterparts. In addition, the combined larval and pupal periods of SR females and males exceeded those of the controls by 2.8 d and 2.3 d, respectively. 【Conclusion】Our results indicate that incorporating $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Sudan Red 7B into an artificial diet can effectively mark *C. suppressalis* eggs, larvae, and adults without significant adverse effects. In addition, this method requires relatively less time and labor than other methods.

Key words *Chilo suppressalis*, growth and development, sudan red, dye marker, artificial diet

昆虫标记技术是昆虫生态学研究的一个重要技术手段, 可用于昆虫种群动态、扩散能力、危害领域、取食行为、营养关系等的研究。标记技术要求不影响靶标昆虫的生理和行为, 且需保

持标记状态的稳定性及辨识度(徐广等, 2000)。目前, 主要的昆虫标记技术有: 喷色标记、放射性同位素标记、分子遗传标记、染色饲料饲喂标记等。放射性同位素标记和分子遗传标记需要特

*资助项目 Supported projects: 贵州省农业攻关计划[NY(2015)3026]; 黔农科院青年基金[(2017)15 号]; 国家重点研发计划[2017YFD0201200-08]; 贵州省优质特色水稻研发与转化及园区技术服务能力建设[黔科合平台人才[2017]5719]

**第一作者 First author, E-mail: ggyydai0328@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: huyanggz@126.com

收稿日期 Received: 2017-03-30, 接受日期 Accepted: 2018-04-10

定的仪器,且成本较高(Armes *et al.*, 1989;李海平, 2012);喷色标记将标记液直接喷到昆虫体表,但易受到雨水和阳光等环境因素的影响(丁强, 2011)。将染色剂添加到人工饲料中,靶标昆虫取食后,其幼虫、蛹、成虫,甚至成虫产出的卵粒都可能被染色。该方法操作简单、稳定、易识别等特点,目前在玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等多种昆虫中进行了使用(Qureshi *et al.*, 2004;赵新成, 2007)。

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 属鳞翅目螟蛾科,是我国为害水稻的三大蛀茎害虫之一。国内各稻区均有分布,主要以长江流域及以南稻区发生较重。近年来,因稻区耕作制度改变、化学农药滥用等原因,二化螟发生数量呈明显上升趋势,全国年发生面积超过 1 667 hm² (黄世文, 2010),严重威胁水稻生产。据笔者所知,关于二化螟的染色饲料饲喂标记,国内外研究未见报道。开展此方面的探索可为开展二化螟种群动态、扩散能力、危害领域、取食行为、营养关系、交配行为等提供大量且龄期一致的染色试虫。因此,本文借鉴在其他鳞翅目昆虫较常使用的苏丹红染料的方法,研究其对二化螟生长发育的影响。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

二化螟虫源于 2015 年 3 月采自贵州省惠水县水稻田,将采集的越冬幼虫带回室内用人工饲料进行饲养,待幼虫化蛹后,将蛹转移至罩有玉米苗的交配笼中,供羽化的成虫产卵,同时放入 10 mL 10%蜂蜜水和 10 mL 纯水以补充成虫营养。将带有黑头期卵块的叶片剪下,两头用蘸水湿滤纸包裹保湿,置于试管中,塞住棉塞,待其孵化后备用。

1.2 染色剂及标记饲料的配制

所用染色剂为苏丹红 7B (Sudan Red 7B),由 Sigma-aldrich 公司生产。将称好的 457 mg 苏

丹红 7B 用 4 570 μ L 吐温 80 浸润后,加入到 909 g 熔融状态的二化螟人工饲料中搅拌均匀,从而获得染色剂浓度为 500 mg $\cdot$ kg⁻¹ 的红色饲料。以常规饲料(胡阳等, 2013)作为对照。

1.3 继代饲养染色标记效果及对二化螟生长发育的影响

继代饲养方法参照胡阳等(2013)的二化螟人工饲养技术。

幼虫期:装有约 120 cm³ 人工饲料的直径 10 cm、高 10 cm 的幼虫饲养盒,保持养虫室内环境温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、相对湿度 50%-60%、L:D=16:8。染色饲料和普通饲料各接试虫 3-6 盒,每盒约 200 头初孵幼虫。更换饲料时 (25 d),对二化螟幼虫的染色情况进行观察并记录。

成虫期:将羽化 24 h 的雌、雄蛾各 1 头置于交配笼中进行配对,并放入生长 30-40 d 玉米苗供其产卵,并饲以 3 mL 10%的蜂蜜水和 3 mL 纯水供成虫补充营养,每隔 1 d 更换蜂蜜水和纯水。成虫试验环境条件为白天温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、相对湿度 60%-70%,夜间温度 (20 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、相对湿度 80%-90%,自然光照。取 10-15 头雌雄成虫,将成虫浸入到 75%酒精中,并观察其腹部染色情况并记录。

卵期:每日观察和记录每头雌虫的产卵情况和卵的染色数量和孵化情况。初孵化幼虫作为下一代的初始虫源,进入下代的饲养。

记录幼虫化蛹率、蛹重、幼虫+蛹历期、蛹羽化率、雌虫产卵量、卵孵化率等参数来研究染色标记对二化螟生长发育的影响。其中幼虫和卵身体均显示为红色,成虫腹部在 75%酒精中显示为红色则为成功标记,其主要染色部位为脂肪体(图 1)。

1.4 统计分析

不同处理同一指标数据用 Tang 和 Zhang (2013) 的 DPS 数据处理系统进行方差分析和多重比较。其中多重比较采用 Tukey's HSD 法。同一世代内对照与染料处理的同一指标差异显著性用 *t*-测验方法。

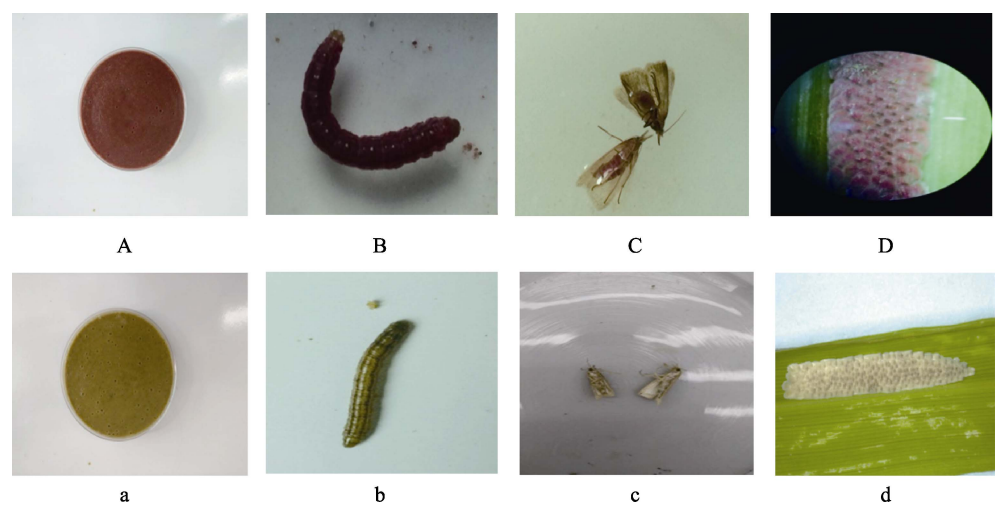


图 1 二化螟各虫态染色效果

Fig. 1 The dyeing effect of different developmental stage of *Chilo suppressalis*

A, B, C, D. 分别为染色饲料、幼虫、成虫和卵；a, b, c, d：分别为常规饲料、幼虫、成虫和卵。
A, B, C and D represent dyed diet, marked larvae, adults and eggs, respectively;
a, b, c and d represent regular diet, normal larvae, adults and eggs, respectively.

2 结果与分析

2.1 染色剂的标记效果

染色剂苏丹红 7B 对二化螟的标记效果见表 1。通过观察第 1-3 代取食含染色剂苏丹红人工饲料的二化螟 25 日龄幼虫（共计 2 665 头）、成

虫（共计 207 头）及其产的卵（共计 5 620 粒），结果发现二化螟幼虫和卵粒呈明显的红色，成虫活体的腹部节间膜也呈现红色，将成虫浸泡在 75%酒精，整个腹部颜色均呈现出明显红色。苏丹红 7B 对二化螟各个发育阶段的染色率达 100%。

表 1 染色剂对二化螟的标记效果
Table 1 Marked *Chilo suppressalis* reared on the dye incorporated artificial diet

处理 Treatments	饲养代数 Generation	幼虫 Larvae (25 d)		成虫 Adults		卵 Eggs	
		观察数 Number of observed	染色率 Dyed rate (%)	观察数 Number of observed	染色率 Dyed rate (%)	观察数 Number of observed	染色率 Dyed rate (%)
苏丹红 Sudan Red 7B	CK						
	G1	1 170	0	96	0	4 005	0
	G2	740	0	62	0	1 686	0
	G3	729	0	67	0	1 803	0
	G1	710	100	48	100	2 313	100
	G2	1 036	100	96	100	1 801	100
	G3	919	100	63	100	1 506	100

2.2 染色标记对二化螟连续 3 代生长发育的影响

在常规饲料和染色饲料饲养的二化螟化蛹率、羽化率、雌虫产卵量、寿命和卵孵化率无显著差异（表 2 和图 2）。染色标记的二化螟各代

平均化蛹率为 44.4%-56.7%，羽化率为 87.3%-96.0%，单雌产卵量为 141.5-231.3 粒，卵孵化率为 79.5%-91.2%，雌雄成虫寿命分别为 6.8-8.3 d 和 6.5-8.6 d，且代间没有显著差异（ $P>0.05$ ）。这些结果说明该剂量的染色剂对二化螟化蛹、羽

化率、雌虫产卵量、成虫寿命和卵孵化率没有显著影响。

在常规饲料和染色饲料中的二化螟蛹重及幼虫+蛹历期有显著差异(图3)。连续3代饲养的染色标记的二化螟雌、雄平均蛹重分别为63.2 mg、47.7 mg, 比对照重5.3 mg、4.2 mg。第1-2代染色标记的二化螟雌雄幼虫+蛹历期分别为47.3-52.3 d、45.6-48.5 d, 比对照显著缩短了1.1-2.5 d、0.9-1.9 d; 但第3代染色标记的二化螟雌雄幼虫+蛹历期分别达54.8 d和52.4 d, 比对照显著延长了12.1 d和9.6 d。连续3代饲养的染色标记二化螟雌、雄平均幼虫+蛹历期比对照延长2.8 d和2.3 d。

3 结论与讨论

通过饲喂可食性染料将昆虫标记成特定颜色是研究昆虫的一种重要技术手段。对昆虫进行饲喂染色标记时, 选择适宜的染色剂及其浓度极为重要, 染色剂对靶标昆虫影响要小, 染色效果要明显且持续, 若染色剂浓度太低, 则可能染色标记效果不明显; 若染色剂浓度太高, 则可能对昆虫产生毒害。本研究发现二化螟幼虫取食 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 苏丹红7B染色的饲料后, 其饲喂当代的幼虫、成虫及下一代成虫产的卵均有100%染色率, 且对二化螟化蛹率、羽化率、成虫寿命、产卵量及卵孵化率均没有显著影响。

表2 连续3代取食不同饲料二化螟的单雌产卵量、卵孵化率和成虫寿命
Table 2 Comparison of fecundity, egg hatching rate and adult longevity of *Chilo suppressalis* fed on dyed diet and on regular diet

指标 Index	第1代 1 st -generation			第2代 2 nd -generation			第3代 3 rd -generation		
			t-检验 t-test (P)			t-检验 t-test (P)			t-检验 t-test (P)
	CK	苏丹红 7B Sudan Red 7B		CK	苏丹红 7B Sudan Red 7B		CK	苏丹红 7B Sudan Red 7B	
产卵量 Fecundity	222.5±12.5a	231.3±24.0a	0.72	171.5±30.6a	207.0±18.7a	0.32	200.8±41.3a	141.5±25.5a	0.27
卵孵化率 Egg hatching	87.7±2.0a	91.2±1.3a	0.15	84.3±2.5a	89.9±2.5a	0.17	90.5±2.0a	79.5±8.5a	0.29
雌成虫寿命 Female adult longevity	7.6±0.2a	6.8±0.5a	0.20	6.5±0.3a	6.9±0.5a	0.51	7.8±0.6a	8.3±0.6a	0.37
雄成虫寿命 Male adult longevity	7.7±0.4a	6.5±0.6a	0.07	7.2±0.6a	6.7±0.8a	0.63	8.3±0.6a	8.6±0.6a	0.75

表中数据为平均值±标准误。字母表示3个世代下同一指标的比较, 相同表示没有显著性差异 ($P<0.05$)。

Data in the table are mean ± SE, and followed by the same letters indicate no significant differences in the same index at three generation of *C. suppressalis* ($P<0.05$).

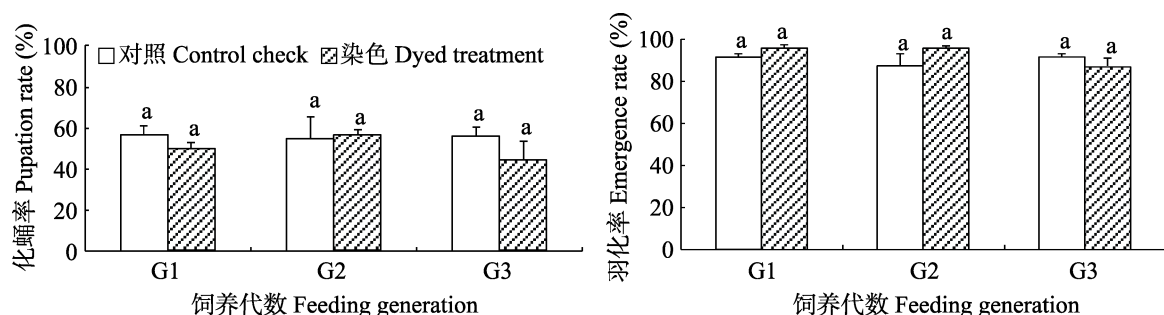


图2 连续3代取食不同饲料二化螟的化蛹率和羽化率

Fig. 2 Pupation rate and emergence rate of *Chilo suppressalis* of different generation on dyes and control diets

数据为平均值±标准误。柱上标有字母表示3个世代下同一指标的比较, 相同表示没有显著性差异 ($P<0.05$)。

Data are mean ± SE. Histograms with the same letters indicate no significant differences in the same index at three generation of *C. suppressalis* ($P<0.05$).

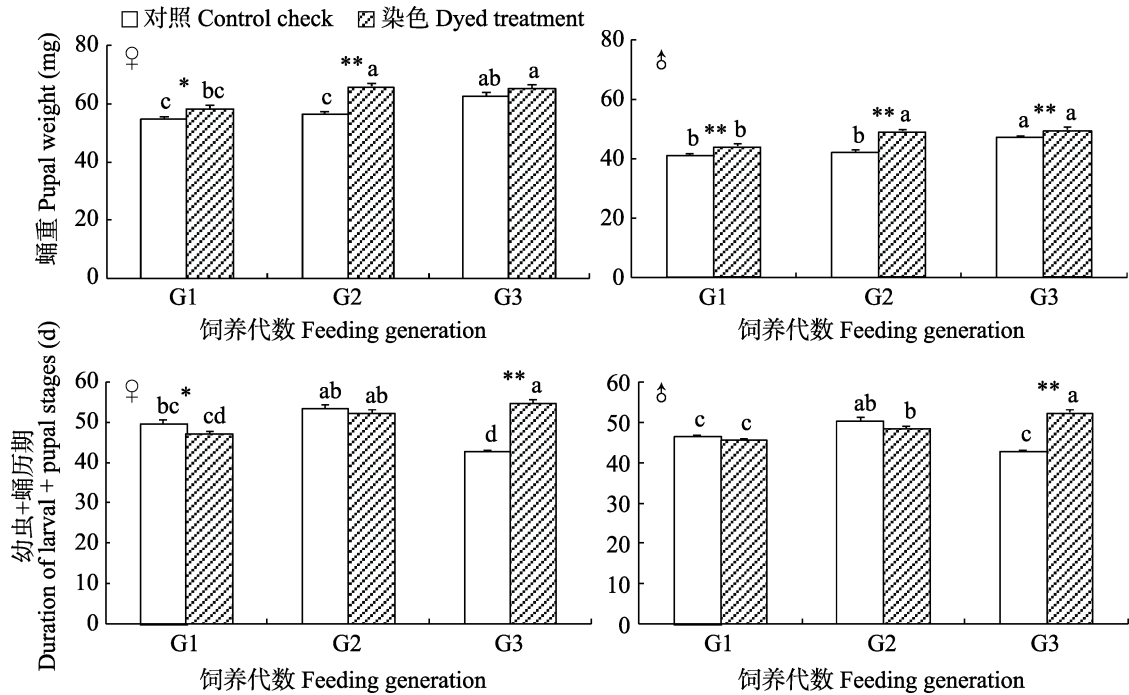


图3 连续3代取食不同饲料二化螟的蛹重和幼虫+蛹历期

Fig. 3 Pupal weight and duration of larval+pupal stage of *Chilo suppressalis* of different generations on dyes and control diets

数据为平均值±标准误。图中*, **分别表示同一世代下苏丹红处理与对照之间同一指标在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 (*t*-测验)。

Data in the table are mean ± SE. * and ** indicates significant differences at 0.05 and 0.01 level in the same index between Sudan Red 7B and control diets at the same generation (*t*-test), respectively.

因此, 500 mg · kg⁻¹ 苏丹红 7B 可作为一种适合标记二化螟的染色剂和浓度。然而, 张和琴等 (1987) 研究发现使用同样浓度的苏丹红 II 染料饲喂玉米螟后发现其化蛹率、羽化率、产卵量和卵孵化率均显著低于对照, 这些差异可能是不同种类昆虫对染色剂的敏感性不同所致。

昆虫蛹重在一定程度上与体内能源物质储备有关, 因此蛹重常用来衡量昆虫对环境适应性的一个重要指标 (Honěk, 1993)。本研究发现取食含苏丹红 7B 饲料后的二化螟雌雄蛹重分别比常规饲料的重 2.6-9.7 mg 和 2.5-7.2 mg。类似的情况也出现于其他一些鳞翅目昆虫, 例如, 孙立全等 (1987) 以相同浓度的苏丹蓝 670 饲喂桃小食心虫 *Carposina sasakii* 后, 其幼虫体重比对照重 1.5 mg。然而, 赵新成 (2007) 研究发现棉铃虫取食含相同浓度的苏丹红 7B 饲料后, 其雌雄蛹重分别比对照减轻 45.0 mg 和 30.6 mg。一般来说, 昆虫取食越多, 其体重相对更大, 而染色

剂可能对昆虫造成一定的取食刺激或是昆虫将染色剂作为食料吸收而增加了体重 (Hendricks, 1971)。

连续 3 代饲养的染色标记二化螟的平均幼虫+蛹历期比对照延长 2.8 d (雌) 和 2.3 d (雄), 发育历期的延长可能与食量增加及染色剂在其体内代谢有关 (Vilarinho *et al.*, 2006; 戴长庚等, 2016)。本研究还发现连续 3 代饲养的染色标记二化螟雄性幼虫+蛹历期比雌性要快 2.6 d, 而对照仅 2.1 d, 即取食了染色剂的二化螟雄虫发育速度更快。通常情况下, 鳞翅目昆虫主要靠幼虫期取食获得大部分营养, 且普遍存在雌虫发育历期较长以获得更多的营养以繁殖后代 (Tammaru *et al.*, 2010)。然而, 二化螟成虫雄性具有先羽化现象 (肖丹凤和胡阳, 2010), 可能会导致其交配竞争力下降 (Fadamiro and Baker, 1999)。因此, 二化螟雌、雄虫对染色剂的代谢和吸收可能也存在差异, 可能是雌虫需要花费更多的代价

代谢染色剂,而使得其发育历期延长,或是雄虫花费更少的代价用于染色剂代谢,从而使得其历期较短。

本研究发现 500 mg · kg⁻¹ 苏丹红 7B 可对二化螟进行有效染色饲料标记,且对其生长发育没有明显影响。

参考文献 (References)

- Armes NJ, King ABS, Carlaw PM, Gadsden H, 1989. Evaluation of strontium as a trace-element marker for dispersal studies on *Heliothis armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 51: 5–10.
- Ding Q, 2011. A labeled liquid in insect's vitro and its blending method. China, ZL201110232624.2. 2013-2-20. [丁强, 2011. 一种昆虫体外标记液及其配制方法. 中国, ZL201110232624.2. 2013-2-20.]
- Dai CG, Li HB, Zhang CR, Xue Y, Ni Y, Hu Y, 2016. Effects of high larval density stress on growth and development of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection*, 43(5): 731–737. [戴长庚, 李鸿波, 张昌荣, 薛原, 倪源, 胡阳, 2016. 高幼虫密度胁迫对二化螟生长发育的影响. 植物保护学报, 43(5): 731–737.]
- Fadamiro HY, Baker TC, 1999. Reproductive performance and longevity of female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: effects of multiple mating, delay in mating, and adult feeding. *Journal of Insect Physiology*, (45): 385–392.
- Hendricks DE, 1971. Oil-soluble blue dye in larval diet marks adults, eggs, and first-stage F1 larvae of the pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 64: 1404–1406.
- Honěk A, 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos*, 66(3): 483–492.
- Hu Y, Zheng YL, Cao GL, Fu Q, 2013. A technique for rearing *Chilo suppressalis* in the large scale with an oligidic diet in laboratory. *Chinese Journal of Rice Science*, 27(5): 535–538. [胡阳, 郑永利, 曹国连, 傅强, 2013. 利用半人工饲料大规模简便化饲养二化螟. 中国水稻科学, 27(5): 535–538.]
- Huang SW, 2010. Key Control Technologies of Diseases and Insect Pests of Rice. Beijing: Jindun Publishing House. 69–72. [黄世文, 2010. 水稻主要病虫害防控关键技术解析. 北京: 金盾出版社. 69–72.]
- Li HP, Shi XY, Liang P, Gao XW, 2012. Effects of insecticides on mitochondrial membrane fluidity of *Chilo suppressalis* measured by a fluorescent DPH probe. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 342–347. [李海平, 史学岩, 梁沛, 高希武, 2012. DPH 标记法研究杀虫剂对二化螟线粒体膜流动性的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 342–347.]
- Qureshi JA, Buschman LL, Throne JE, Ramaswamy SB, 2004. Oil-soluble dyes incorporated in meridic diet of *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) as markers for adult dispersal studies. *Journal of Economic Entomology*, 97(3): 836–845.
- Sun LQ, Zhang HQ, Li YY, 1987. Studies on dispersal of sterile peach fruit borer (*Carposina nipponensis* Wals.) by using mark-release-recapture technique. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1(1): 29–37. [孙立全, 张和琴, 李元英, 1987. 采用染色标记法研究不育桃小食心虫(*Carposina nipponensis* Wals.) 扩散规律. 核农学报, 1(1): 29–37.]
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.
- Vilarinho EC, Fernandes OA, Omoto C, Hunt TE, 2006. Oil-soluble dyes for marking *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6): 2110–2115.
- Tammaru T, Esperk T, Ivanov V, Teder T, 2010. Proximate sources of sexual size dimorphism in insects: locating constraints on larval growth schedules. *Evolutionary Ecology*, 24: 161–175.
- Xiao DF, Hu Y, 2010. A preliminary research on protandry in rice striped stem borer. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(4): 736–739. [肖丹凤, 胡阳, 2010. 二化螟成虫雄性先羽化现象. 昆虫知识, 47(4): 736–739.]
- Xu G, Guo YY, Wu KM, Jiang JW, 2000. On the mark-release techniques of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Gossypii Sinica*, 12(5): 247–250. [徐广, 郭予元, 吴孔明, 蒋金炜, 2000. 棉铃虫标放技术研究. 棉花学报, 12(5): 247–250.]
- Zhang HQ, Zhao CD, Liu QR, Hang SQ, Wang HS, Lou HZ, 1987. Labelling corn borer larvae reared on artificial medium with sudan blue II. *Application of Atomic Energy in Agriculture*, (1): 39–42. [张和琴, 赵才道, 刘琼茹, 杭树群, 王华嵩, 楼洪章, 1987. 苏丹兰 II 号染色标记人工饲养玉米螟的研究及应用. 原子能农业应用, (1): 39–42.]
- Zhao XC, 2007. Investigations on calling behavior and mating behavior of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations with differently genetic backgrounds. Post-doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [赵新成, 2007. 不同遗传背景棉铃虫的求偶和交配行为比较研究. 博士后学位论文. 北京: 中国农业科学院.]