

灭幼脲对粘虫不育作用的机理*

陈 霏 弓惠芬 王进忠 丁建云

(北京农学院,北京 102208)

王 宗 舜

(中国科学院动物研究所,北京 100080)

摘要 通过一系列组织学观察和生物化学测定,研究了灭幼脲在粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 雌蛾体内及其所产卵内的作用及影响。灭幼脲(50ppm)经雌蛾连续取食后,卵巢中 DNA、RNA 的合成及卵巢对血淋巴中蛋白质的吸取均被促进,卵巢细胞核中 DNA、RNA 及蛋白质的含量均比正常雌蛾增加,卵巢发育及卵子形成亦被促进,产卵量正常。粘虫生殖系统未受灭幼脲的抑制。胚胎发育阶段细胞核及线粒体中 DNA 的含量均因雌蛾取食灭幼脲而降低,但胚胎发育并不中断,幼虫分化可达黑头期。灭幼脲导致粘虫所产卵不能孵化的主要原因在于幼虫分化过程中体壁及气管系统的形成受到严重抑制。体壁皮细胞缩小呈扁平形,无细胞核,连成线状,有断裂;原表皮缺乏或极薄。虫体内无气管分布。幼虫死于卵壳内。灭幼脲的不育作用和直接杀卵作用实质上都是对正在分化幼虫中几丁质合成的抑制。本文对灭幼脲的毒理机制进行了讨论。

关键词 粘虫 灭幼脲 卵巢发育 胚胎发育

众所周知,灭幼脲(Diflubenzuron)系昆虫几丁质合成抑制剂中发现早而有代表性的品种,它能杀卵、杀幼虫和导致成虫不育。关于其作用机理,已往国内外一些学者多针对杀幼虫进行研究,提出了种种见解。而对杀卵和引起成虫不育的机理研究很少。Mitlin 等(1977)报道,经灭幼脲处理的棉象蚬 *Anthonomus grandis* Boheman 雌成虫 DNA 的合成受到抑制,而 RNA 及蛋白质都不受影响。某些雄虫的睾丸生长受到抑制,甚至睾丸管生殖区遭到毁灭。

本项研究首次对灭幼脲导致粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 不育的作用机理进行了一系列组织学观察和生物化学测定,并与直接杀卵作用加以比较。由于与 Mitlin (1977)的实验所用昆虫不同,生化方法不同,所得结果也很不相同。

现将结果列文于下。

材料及方法

一、虫源饲养

1990年5月将江苏省邳江县麦田粘虫4—5龄幼虫携回北京,在室内饲养繁殖后进行各项实验。人工气候养虫室温度23°—25℃,相对湿度80—85%。成虫饲以10%蔗

本文于1991年10月收到。

* 本项研究得到北京市高教局资助。

中国科学院动物研究所郭鄂先生热情支持,于延芬同志拍摄部分照片。江苏省里下河地区农科所褚柏先生协助虫源采集工作。在此一并致谢。

糖水,幼虫饲喂人工饲料,采用毕富春(1983)研制的配方。所饲粘虫各虫态生长发育整齐健壮。

二、供试药剂

灭幼脉结晶的有效成分含量为 90% 以上。河北省唐山市化工研究所产品。

三、实验方法

(一) 药效测定 取同日羽化 12 小时内的成虫进行测定,粘虫不同性别、药物不同浓度及饲药时间长短等详见各表。处理组成虫饲以含灭幼脉的 10% 蔗糖液;对照组成虫仅饲以 10% 蔗糖液。直接杀卵试验为处理组用正常成虫刚产下的卵,浸渍于灭幼脉丙酮溶液中;对照组仅以丙酮液浸卵。

(二) 组织学观察 按常规方法解剖成虫咽侧体、脂肪体及卵巢,在光学显微镜下观察、测量和拍照。胚胎发生及幼虫分化观察以体壁及气管系统为重点。剥去卵壳做石蜡切片,染色、制片后在光镜下观察、拍照。

(三) 生化测定

1. 以差级离心技术分离卵巢及卵中各亚细胞组分后,根据夏邦颖(1988)介绍的方法进行细胞核、线粒体及上清液中 DNA、RNA 及蛋白质的提取。再以二苯胺法、苔黑酚法及 Folin-酚试剂法分别进行 DNA、RNA 及蛋白质的定量测定。

2. 放射性同位素双标记化合物体内注射及液闪测量其在卵巢中 DNA、RNA 及蛋白质中的掺入量。所用标记化合物为 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷及 ^{14}C -甘氨酸; ^3H -尿嘧啶核苷及 ^{14}C -甘氨酸,均系上海原子能研究所产品。成虫羽化取食灭幼脉(50ppm)一定时间后于胸腹节间膜处注射,剂量为 ^3H 尿苷- ^{14}C 甘氨酸(4.9:1) ($16.75\mu\text{Ci}/25\mu\text{l}; 3.4\mu\text{Ci}/5\mu\text{l}$)/头; ^3H 胸苷- ^{14}C 甘氨酸(5.4:1) ($18.5\mu\text{Ci}/25\mu\text{l}; 3.4\mu\text{Ci}/5\mu\text{l}$)/头。注射后经过 3 及 6 小时解剖出卵巢,称重后,制备样品。将样品滴加在微孔膜(0.45 μm)上,洗涤固定。所用闪烁液由甲苯中加入 PPO 和 POPOP 配制而成。闪烁仪为 Beckman-9800 型。仪器自身运算并打印出 ^3H 及 ^{14}C 的 DPM (每分钟蜕变数)值。

3. 卵巢体外培养,并结合双标记液闪测量。所用 Grace 培养液为 GIBC 产品,将灭幼脉(50ppm)加入灭菌后的 Grace 液中。解剖出卵巢灭菌后培养一定时间,温度 27 $^{\circ}\text{C}$,再加入双标记化合物,培养 3 及 5 小时。然后卵巢匀浆,制备样品。以液闪仪测定 ^3H 及 ^{14}C 的 DPM 值。

4. 以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及薄层扫描,测定卵巢及胚胎发育两阶段中蛋白质的变化。凝胶浓度 10%,电泳仪为 DY-WZ 电泳仪。电泳后,作出标准蛋白(BDH 化学有限公司产品)分子量和迁移率的标准曲线,根据未知蛋白的迁移率,测出其分子量。用日本岛津 CS-930 型扫描仪扫描,比较各蛋白带的峰面积。

结 果

一、灭幼脉的不育性效果与直接杀卵效果

在整个成虫期内,连续饲喂 0.625ppm 灭幼脉,即可导致所产卵全部不能孵化,表明灭幼脉对粘虫具有显著的不育性效果。然而灭幼脉仅对雌蛾有不育作用,对雄蛾则无效。灭幼脉在虫体内有可逆性,在雌蛾羽化后三天内饲药(50ppm),仅能抑制前期所产卵的

孵化,后期产下的卵则仍可孵化。灭幼脲对粘虫成虫的交配率、产卵量及寿命均无影响(表 1—3)。

表 1 灭幼脲短期饲喂粘虫蛾的不育性效果

处 理			配对数	平均每头交配雌蛾产卵粒数			各期卵孵化率(%)		
浓 度 ppm	喂药时间 (日/月)	组 别		2—3/1 (日/月)	4—5/1 (日/月)	6—7/1 (日/月)	2—3/1 (日/月)	4—5/1 (日/月)	6—7/1 (日/月)
50	27—30/12	处理♀×处理♂	4	385	243	240	0	0	100
	28—31/12	处理♀×正常♂	4	108	0	239	0	—	97.7
	28—31/12	正常♀×处理♂	4	0	350	271	—	98.9	100
0	28—31/12	正常♀×正常♂	4	295	386	336	96.0	100	100

表 2 灭幼脲连续饲喂粘虫蛾的不育性效果

处 理		配对数	平均每头交配雌蛾产卵粒数							各期卵孵化率(%)						
浓 度 (ppm)	喂药时间 (日/月)		2—3	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	2—3	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8		
10.0	26/9—8/10	5	97	159	134	144	51	3	0	0	0	0	0	0		
5.0	26/9—8/10	5	0	121	108	43	67	7	—	0	0	0	0	0		
2.5	26/9—8/10	5	149	119	95	130	80	13	0	0	0	0	0	0		
1.25	26/9—8/10	5	89	234	174	114	166	12	0	0	0	0	0	0		
0.625	26/9—8/10	5	144	176	202	90	53	21	0	0	0	0	0	0		
0	26/9—8/10	5	186	161	189	50	95	13	96.7	92	98.9	100	100	100		

注: 调查时间为 1990 年 10 月。

表 3 灭幼脲对粘虫蛾交配率、产卵量及寿命的影响

处 理		交配率(%)	平均每雌产卵粒数	平均寿命(日)	
浓 度 (ppm)	喂药时间 (日/月)			♀	♂
50.0	27/12—30/12	75	868	14.5	18
10.0	26/9—8/10	80	588	11.8	—
5.0	26/9—8/10	75	346	10.5	—
2.5	27/12—30/12	80	585	12.5	—
1.25	27/12—30/12	100	789	11.6	—
0.625	27/12—30/12	80	744	12.5	—
0.0	27/12—30/12	100	694	10.8	15.7

以灭幼脲(50—400ppm)浸渍刚产下的粘虫卵,亦显著抑制卵的孵化(表 4)。

二、灭幼脲对粘虫胚胎发生和幼虫分化的影响

(一) 对体壁及气管系统形成的抑制作用

粘虫成虫经灭幼脲处理后所产下的卵,其胚胎发育并不中断,卵内幼虫可达黑头期,一般状况与对照组正常卵相同。但其体壁及气管系统的形成受到了明显的抑制。临孵化前的幼虫皮细胞小而扁平,细胞核不明显或无,细胞内含物不饱满,细胞间隙不清楚,连成

表 4 灭幼脲对粘虫卵的直接杀卵效果*

处理浓度 (ppm)	卵 粒 数	88.5 小时检查		105 小时检查			
		孵化粒数	未孵化粒数	孵化粒数	未孵化粒数	孵化率 (%)	孵化率降低 (%)
400	252	0	252	0	252	0	100
200	247	0	247	0	247	0	100
50	203	0	203	0	203	0	100
0	313**	—	—	313	0	100	—

* 粘虫卵产下 10 小时浸于灭幼脲溶液中 10 分钟。

** 88.5 小时已开始孵化。

线状,发生断裂现象。原表皮缺乏或极薄,以至皮细胞层与角质精层紧贴。角质精层的小突起形状不一,排列稀疏或紊乱。虫体内无气管系统的分布。而与正常卵内幼虫显然有别(见表 5—6,图版 I)。

表 5 粘虫蛾食入灭幼脲后所产卵的胚胎发生及幼虫分化状况

卵 龄 (小时)	胚胎发生及幼虫分化(25℃)	
	对 照 组	灭 幼 脲 组
15	浆膜、羊膜明显,其间充满卵黄,胚带延长,呈 U 形,原躯分节。	同 对 照
39	胚带达最长,卷曲,头、尾接近,仍呈 U 形。颚节(上颚、下颚、下唇),胸部原肢节(前、中、后胸足)及各腹节十分明显。	同 对 照
63	虫体已形成,仍在羊膜腔内,头、胸、腹的皮细胞呈方形,体积大,细胞核明显,细胞内含物饱满。细胞排列整齐,间隙明显。有的皮细胞已特化成毛原细胞或绛色细胞,但尚无角质精层的分泌。	同 对 照
87	虫体进一步发育,体壁出现琥珀色角质精层,其小突起形状一致排列整齐;皮细胞仍呈方形饱满,核明显,细胞间界线清楚;已分泌出含有几丁质的原表皮,原表皮厚而均匀(图版 I:1)。气管系统亦形成,气门、气门气管、气管纵干均明显可见(图版 I:3—6)。	体壁及气管系统的形成受阻。角质精层小突起形状不一,排列稀疏或重叠紊乱,色黑;皮细胞小而扁平,内含物不饱满,核不明显或无,细胞连成线状,有断裂;原表皮缺乏或极薄,皮细胞层与角质精层紧贴(图版 I:2)。气管系统未形成(图版 I:7)。

以灭幼脲直接处理粘虫刚产下的卵,而药物不经过成虫体内途径,其生理效应与处理成虫者相同,也是卵内幼虫体壁及气管系统的形成严重受阻,而在临孵化前死亡(见表 7)。

从上述灭幼脲处理成虫导致卵不能孵化和直接处理卵造成不能孵化二者的最终症状相同这一点充分表明,灭幼脲发挥作用的关键时期不是在雌成虫体内而是在胚胎发育幼虫分化阶段,尤其是卵发育到 63—87 小时之间,因此时正处于皮细胞的分泌盛期。再从

表 6 灭幼脲饲喂粘虫蛾对卵内幼虫气管系统形成的影响

组 别	卵 龄 (小时)	解剖卵 粒数	气管侧纵干		体表皱缩及黑纹		头壳及上颚发育程度	
			形 成	未形成	多	少	良 好	较 差
灭幼脲 (50ppm)	88	10		10	✓			✓
	110.5	254		254	✓			✓
对 照 (0ppm)	88	234	234			✓	✓	
	110.5	180	180*			✓	✓	

* 全部孵化。

表 7 灭幼脲浸粘虫卵对卵内幼虫气管系统形成的影响

处理浓度 (ppm)	卵 龄 (小时)	解剖卵 粒 数	气管侧纵干		体表皱缩及黑纹		头壳及上颚发育程度	
			形 成	未形成	多	少	良 好	较 差
400	105	109		109	✓			✓
200	105	159		159	✓			✓
50	105	98		98	✓			✓
0	88.5	86	86			✓	✓	
	105*	105	105			✓	✓	

* 全部孵化。

体壁和气管系统的形成严重受阻来看,灭幼脲的毒理主要是影响皮细胞的分泌活动和几丁质的合成。

(二) 对核酸及蛋白质的影响

粘虫卵各亚细胞组分中核酸及蛋白质的含量测定结果证明:粘虫成虫取食灭幼脲(50ppm)后产下卵的胚胎发育过程中,细胞核及线粒体中的 DNA 含量明显比正常粘虫卵降低。而 RNA 及蛋白质似无影响(表 8—10)。

灭幼脲对 DNA 合成的抑制是从胚胎发育早期开始的,直至幼虫临孵化之前。然而

表 8 灭幼脲在粘虫卵胚胎发育及幼虫分化过程中对各亚细胞组分核酸的影响*

胚胎发育 时 间 (小时)	DNA						RNA					
	细 胞 核		线 粒 体		10000g 上 清 液		细 胞 核		线 粒 体		10000g 上 清 液	
	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照
24	66.66	86.48	3.90	15.46	0.6	17.12	34.92	34.92	9.32	8.41	8.75	6.13
48	71.62	109.61	0.60	17.12	0.6	17.12	26.84	32.64	12.73	12.73	16.14	16.71
72	63.26	89.78	0.60	17.12	2.3	23.72	21.26	26.84	20.12	6.36	21.26	21.83
96	58.02	63.20	2.38	10.86	14.0	21.34	34.07	20.35	1.07	1.58	32.98	32.26

* 单位: 微克/100 粒卵。

表 9 灭幼脲在粘虫卵胚胎发育及幼虫分化过程中对各亚细胞组分蛋白质的影响*

胚胎发育时间 (小时)	蛋 白 质			
	细 胞 核		10000g 上清液	
	灭 幼 脲	对 照	灭 幼 脲	对 照
24	96.81	89.38	104.80	30.16
48	50.71	101.27	127.19	52.55
72	101.27	107.27	99.78	74.50
96	37.84	80.38	85.43	128.08

* 单位: 微克/100 粒卵

表 10 灭幼脲对粘虫胚胎发育过程中 DNA、RNA 及蛋白质总含量的影响*

胚胎发育时间 (小时)	DNA		RNA		蛋白质	
	灭 幼 脲	对 照	灭 幼 脲	对 照	灭 幼 脲	对 照
24	71.16	117.06	52.99	49.46	201.61	119.54
48	72.82	143.85	61.56	70.61	177.90	153.82
72	66.22	130.62	62.64	55.03	201.05	181.72
96	72.41	95.46	68.13	54.19	123.27	208.46

* 单位: 微克/100 粒卵, 时间为小时。

并未造成胚胎发育的中途停止。这与烷化剂(核酸及蛋白质抑制剂)或保幼激素类似物处理昆虫成虫导致胚胎发育中断的结果不相同。因此, 它不像是造成卵不能孵化的主要原因。

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及薄层扫描测定灭幼脲处理成虫和正常成虫所产的卵, 都显示出 16 个蛋白质谱带, 其中均包括卵黄蛋白的 3 个亚单位。而且处理成虫产下的卵在发育初期卵黄蛋白含量高于正常成虫所产的卵, 间接表明灭幼脲对产生于雌成虫体内的卵黄蛋白具有促进作用。

三、灭幼脲对粘虫卵巢发育和卵子形成的影响

(一) 对卵巢卵子的促进作用

粘虫成虫连续取食灭幼脲 (50ppm) 后, 卵巢重量比对照组有所增加(表 11)。位于卵巢管基部的卵室及卵母细胞大小, 均于发育至 70 余小时时开始明显比对照组粘虫的增

表 11 灭幼脲对粘虫卵巢鲜重的影响

卵巢发育时间 (小时)	解剖雌虫数 (头)	平均每雌卵巢鲜重 (mg)	
		灭 幼 脲	对 照
38	9	4.53	3.62
86	10	14.53	13.06
122	6	18.08	16.33
134	9	17.10	18.06
169	10	21.29	19.08
218	10	16.31	9.80

表 12 灭幼脲对粘虫卵子形成大小的影响

测量次数*	卵巢发育时间 (小时)	平均卵室面积**(μm^2)		平均每卵母细胞面积**(μm^2)	
		灭幼脲 ($\bar{x} \pm \text{SEM} \times 10^3$)	对 照 ($\bar{x} \pm \text{SEM} \times 10^3$)	灭幼脲 ($\bar{x} \pm \text{SEM} \times 10^3$)	对 照 ($\bar{x} \pm \text{SEM} \times 10^3$)
I	24	29.67 \pm 1.79	25.44 \pm 3.28	6.63 \pm 0.39	5.32 \pm 0.96
	72	193.07 \pm 38.22	121.97 \pm 26.5	147.4 \pm 36.77	110.22 \pm 47.84
	125	260.13 \pm 8.37	242.47 \pm 26.5	198.08 \pm 6.38	197.20 \pm 11.84
	168	281.88 \pm 19.77	280.80 \pm 13.29	242.25 \pm 25.80	230.19 \pm 23.36
II	32	41.45 \pm 9.36	22.35 \pm 1.24	10.87 \pm 2.56	5.50 \pm 0.64
	57	30.78 \pm 3.69	33.22 \pm 2.19	7.88 \pm 1.21	8.20 \pm 0.81
	76	55.58 \pm 0.63	31.04 \pm 2.65	20.77 \pm 4.32	9.17 \pm 1.48
	98	85.33 \pm 5.79	66.66 \pm 8.07	45.02 \pm 5.81	26.98 \pm 6.33
	122	221.91 \pm 31.95	188.60 \pm 22.65	176.50 \pm 28.69	149.66 \pm 24.78
	142	265.07 \pm 41.05	105.13 \pm 12.24	219.99 \pm 37.81	81.35 \pm 10.48
	168	290.78 \pm 8.36	258.27 \pm 12.31	249.80 \pm 8.66	222.05 \pm 10.68
	216	235.57 \pm 22.36	207.15 \pm 19.52	192.75 \pm 18.91	172.61 \pm 21.74

* 第一次测定,不同发育时间各取 3—6 头;卵室数 38—120 个,均为卵巢基部 1—5 个卵室。第二次测定,不同发育时间各取 4 头,卵室数 40 个,卵室部位同第一次测定。

** 卵室及卵母细胞的大小均以最大长度 \times 最大宽度计算。

表中 \bar{x} 为平均值, $\text{SEM} = S/\sqrt{n}$, $S = \sqrt{\sum(x - \bar{x})^2/(n-1)}$ 。

加(见表 12)。粘虫初羽化时,卵巢管基部的卵母细胞体积约为与其相应的四个滋养细胞总合的 1/2。由此时起,卵子形成的速度灭幼脲组逐渐加快,而且卵壳形成后冲出卵管塞而进入卵管柄和侧输卵管的具壳卵数比对照组同期为多(见表 13)。充分表明灭幼脲对粘虫卵巢发育及卵子形成起了促进作用。这与保幼激素对卵巢发育的效应极为相似。

表 13 灭幼脲对粘虫卵子发育进度的影响

组 别	卵巢发育时间 (小时)	取 样 数			卵形成各期百分率(%)*							冲出卵管塞的卵粒数		
		雌蛾	卵巢管	卵室	A	B	C	D	E	F	G	卵管柄	侧输卵管	中输卵管
灭幼脲 对照	14	5	18	75			80	20						
		3	11	55			100							
灭幼脲 对照	74	5	20	100					8	92				
		6	23	115					46	54				
灭幼脲 对照	124	5	20	100							100	38	5	0
		6	23	131							100	14	3	0
灭幼脲 对照	168	3	12	49							100	85	10	0
		3	12	53							100	0	0	0

* 卵子形成的分期参考孙少轩和牟吉元(1963)划分的标准,分为七个时期。

表中 C—G 期,简要说明如下:

C 期: 卵母细胞长扁形,体积约为 4 个滋养细胞的 1/2。

D 期: 卵母细胞长方形,体积约为 4 个滋养细胞的总合。

E 期: 卵母细胞四方形,体积超过 4 个滋养细胞的总合。

F 期: 卵母细胞长圆形,体积迅速增大,而滋养细胞缩小、退化。

G 期: 卵母细胞球形,滋养细胞消失,卵子包被在由卵泡细胞分泌的卵壳内。

(二) 对核酸及蛋白质的影响

粘虫卵巢各亚细胞组分中 DNA、RNA 及蛋白质的定量测定结果证明: 粘虫成虫取食灭幼脲 (50ppm) 后, 卵巢细胞核中 DNA、RNA 及蛋白质含量均比正常粘虫增加; 而线粒体中 DNA 及 RNA 含量均比正常粘虫减少(表 14、15)。粘虫体内注射标记化合物, 液闪测量结果证明: 粘虫成虫取食灭幼脲 (50ppm) 后, ^3H -胸腺嘧啶核苷、 ^3H -尿嘧啶核苷及 ^{14}C -甘氨酸, 分别在卵巢中 DNA、RNA 及蛋白质中的掺入量均比正常粘虫

表 14 灭幼脲在粘虫卵巢发育过程中对各亚细胞组分 DNA、RNA 的影响

测定次数	卵巢发育时间 (小时)	DNA (微克/卵巢)				RNA (微克/卵巢)			
		细胞核		线粒体		细胞核		线粒体	
		灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照
I	47	27.69	24.32	2.45	2.45	24.99	21.23	2.91	3.25
	87	72.40	55.64	3.07	6.07	32.70	29.02	—	—
	141	121.45	116.24	6.13	10.1	55.14	53.08	0.87	3.55
	185	69.96	44.71	15.88	24.29	18.68	5.90	—	—
II	86	33.17	27.17	0.0	15.28	23.19	21.18	0.61	13.09

表 15 灭幼脲在粘虫卵巢发育过程中对各亚细胞组分蛋白质的影响

测定次数	胚胎发育时间 (小时)	蛋白质(微克/卵巢)			
		细胞核		线粒体	
		灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照
I	47	43.64	37.66	33.92	13.38
	87	160.89	78.82	33.07	26.07
	141	247.01	240.16	59.65	106.30
	185	276.06	160.29	5.30	29.58
II	86	187.51	159.52	0.78	0.00

为多, 差异极显著(表 16)。这说明灭幼脲促进了卵巢中 DNA、RNA 的合成及卵巢对血淋巴中蛋白质的吸取。粘虫卵巢体外培养, 标记化合物液闪测量结果证明: 在含有灭幼脲 (50ppm) 的 Grace's 液中培养 12 小时加标记化合物再经 5 小时的粘虫卵巢, DNA 中 ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入量比正常粘虫的为多, 差异极显著。RNA 中 ^3H -尿嘧啶核苷的掺入量在掺入 3 小时时, 亦比正常粘虫的显著增多(表 17)。同样说明灭幼脲促进卵巢中 DNA 及 RNA 的合成。然而卵巢蛋白质中 ^{14}C -甘氨酸的掺入量与正常粘虫者相比则无显著差异(表 17), 表明粘虫卵巢中蛋白质主要不是由卵巢自身合成。粘虫卵巢中

蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及扫描结果证明: 粘虫成虫食入灭幼脲 (50ppm) 后, 卵巢中蛋白质含量明显比正常粘虫者增加, 而且主要体现在卵黄蛋白(图 1)。说明灭幼脲对粘虫卵巢从血淋巴中摄取卵黄蛋白和此种蛋白经修饰而在卵母细胞中的沉积, 具有一定的促进作用。

表 16 灭幼脲在粘虫卵巢发育过程中对 ^3H + ^{14}C 双标记化合物掺入量的影响

组 别	卵巢发育 时间 (小时)	注射后 掺入时间 (小时)	甲基 ^3H -胸腺嘧啶核苷 + ^{14}C -甘 氨酸掺入量		^3H -尿嘧啶核苷 + ^{14}C -甘氨酸 掺入量	
			DNA DPM $\times 10^3$ /卵巢	蛋 白 质 DPM $\times 10^3$ /卵巢	RNA DPM $\times 10^3$ /卵巢	蛋 白 质 DPM $\times 10^3$ /卵巢
灭幼脲 对照	27	3	162.28 ^A	48.99 ^a		
	27	3	53.74 ^B	40.46 ^a		
灭幼脲 对照	27	6	337.16 ^A	90.15 ^A		
	27	6	45.37 ^B	36.69 ^B		
灭幼脲 对照	90	3	281.19 ^A	212.69 ^A	350.98 ^A	186.51 ^A
	90	3	125.29 ^B	91.85 ^B	66.75 ^B	36.43 ^B
灭幼脲 对照	90	6	386.37 ^A	178.31 ^A	318.92 ^A	201.05 ^A
	90	6	272.78 ^B	143.36 ^B	90.48 ^B	33.18 ^B

DPM = 每分钟蜕变数。

A、B 表示在 $\alpha = 0.01$ 水平上差异显著, a、b 表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著 ($n = 12$), 相同字母表示差异不显著。

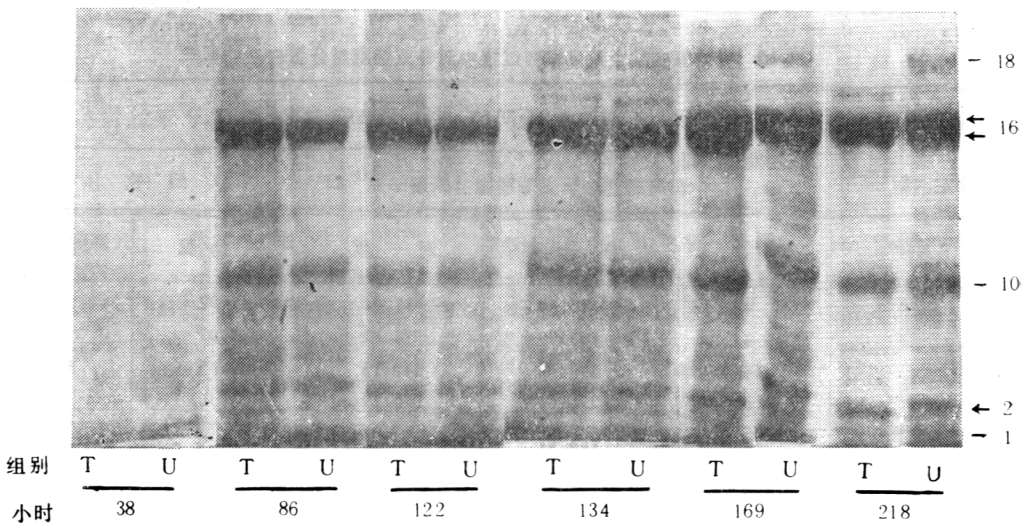


图 1 粘虫卵巢发育过程中蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
T: 灭幼脲组 U: 对照组 箭头表示卵黄原蛋白的三个亚单位

四、灭幼脲对粘虫脂肪体和咽侧体的影响

粘虫成虫期的生命活动以生殖为中心。咽侧体合成并分泌保幼激素; 脂肪体合成并释放卵黄原蛋白; 卵巢从血淋巴中吸取卵黄原蛋白, 此种蛋白经修饰为卵黄蛋白, 沉积于卵母细胞中。而保幼激素对脂肪体及卵巢均起调控作用, 卵巢发育又对咽侧体具有正或负反馈作用。因此咽侧体-脂肪体-卵巢三者的关系是研究灭幼脲不育作用机理中不容忽

表 17 粘虫卵巢体外培养条件下, 灭幼脲对 $^3\text{H} + ^{14}\text{C}$ 双标记化合物掺入量的影响

组别	饲喂时间	卵巢培养时间 (小时)	加入双标记化合物掺入时间 (小时)	甲基 ^3H -胸腺嘧啶核苷 + ^{14}C -甘氨酸掺入量		^3H -尿嘧啶核苷 + ^{14}C -甘氨酸掺入量	
				DNA DPM $\times 10^3$ /卵巢	蛋白质 DPM $\times 10^3$ /卵巢	RNA DPM $\times 10^3$ /卵巢	蛋白质 DPM $\times 10^3$ /卵巢
灭幼脲对照	0	12	3	31.23 ^a	1.25 ^a	456.27 ^a	—
	0	12	3	63.69 ^a	1.94 ^a	312.21 ^b	—
灭幼脲对照	0	12	5	46.70 ^A	1.72 ^a	109.45 ^a	1.57 ^a
	0	12	5	18.21 ^B	1.86 ^a	88.58 ^a	1.43 ^a
灭幼脲对照	72	9	5	17.20 ^a	1.81 ^a	139.06 ^a	1.21 ^a
	72	9	5	14.32 ^a	2.75 ^a	79.99 ^b	1.14 ^a

DPM = 每分钟蜕变数。饲喂时间指羽化后至培养前以蔗糖水饲喂的小时数。

a、b 不同字母表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著 ($n = 6$)，相同字母表示差异不显著。

视的问题。

观察表明, 灭幼脲 (50ppm) 对粘虫雌成虫脂肪体具有一定的刺激作用 (表 18)。此与卵巢中蛋白质含量的增多呈正相关。然而在一定程度上却对咽侧体有抑制作用 (表 19)。初步认为: 1. 灭幼脲分布到血淋巴中, 具有保幼激素效应, 而咽侧体中保幼激素的合成及分泌减少, 体积缩小; 2. 灭幼脲促进了卵巢发育, 这也是由于它的保幼激素效应, 而高度发育的卵巢对咽侧体起负反馈作用, 使咽侧体受到了抑制; 3. 灭幼脲对咽侧体有直接抑制作用。而灭幼脲对血淋巴中保幼激素具有补偿, 促进了脂肪体和卵巢发育。

表 18 灭幼脲对粘虫成虫脂肪体的影响

发育时间 (小时)	脂肪体发育情况	
	对 照	灭 幼 脲
14	脂肪体细胞群大多团聚成条带状, 少数呈圆球状, 脂肪体营养细胞呈柱形, 体积小, 细胞核明显, 细胞界限较清楚, 细胞内蛋白质颗粒小而稀少。	脂肪体细胞大多团聚呈圆球状, 少数呈条带状, 脂肪体营养细胞呈柱形, 体积大, 细胞核明显, 细胞界限清楚, 细胞内蛋白质颗粒大而稠密。
74	脂肪体细胞大多团聚呈圆球状, 少数呈条带状, 脂肪体营养细胞柱形, 体积大, 细胞核明显, 细胞界限清楚, 细胞内蛋白质颗粒大而稠密。	同 对 照
124	脂肪体细胞大多团聚呈圆球状, 少数呈条带状, 脂肪体营养细胞柱形, 体积大, 细胞核明显, 细胞界限清楚, 细胞内蛋白质颗粒大而稠密。	同 对 照
168	脂肪体细胞大多团聚呈圆球状, 脂肪体营养细胞柱形, 体积大, 细胞核明显, 细胞界限清楚, 细胞内蛋白质颗粒多。	同 对 照

表 19 灭幼脲对粘虫蛾咽侧体的影响

性 别	发育 日数	虫数(头)		测量咽侧体数		咽侧体平均体积 (μm^3)	
		灭幼脲	对 照	灭幼脲	对 照	灭 幼 脲	对 照
♀	1	6	5	12	9	4.4×10^6	5.8×10^6
	2	6	5	12	10	4.8×10^6	6.2×10^6
	3	7	7	14	13	4.7×10^6	6.5×10^6
	4	7	7	13	14	5.1×10^6	6.9×10^6
	5	7	7	14	14	5.6×10^6	5.3×10^6
	6	3	3	6	6	3.5×10^6	5.9×10^6
	7	3	3	6	6	2.1×10^6	5.4×10^6
平 均						4.3×10^{6A}	6.0×10^{6B}
♂	1	2	3	4	6	0.53×10^7	1.10×10^7
	2	2	4	4	8	1.20×10^7	1.60×10^7
	3	3	3	6	5	0.98×10^7	1.00×10^7
	4	3	3	6	5	1.00×10^7	1.70×10^7
	5	3	1	5	2	1.00×10^7	2.30×10^7
	6	3	3	6	4	1.20×10^7	1.90×10^7
	7	3	3	6	6	1.00×10^7	1.30×10^7
平 均						0.987×10^{7A}	1.557×10^{7B}

A、B 表示在 $\alpha = 0.01$ 水平有极显著性差异。

总之,灭幼脲在粘虫雌成虫体内的上述种种影响并未导致生殖机能的抑制,都不能成为所产下的卵不能孵化的起因。而灭幼脲由雌虫体内转移到卵中,在胚胎发育阶段幼虫分化过程中,干扰几丁质的合成,抑制体壁和气管系统的形成,造成卵壳内幼虫的死亡,乃是其不育作用的主要原因。

讨 论

关于灭幼脲的毒理机制,已有许多研究,见解不一。现就本实验中遇到的疑点提出讨论。

一、灭幼脲对皮细胞的影响

粘虫雌蛾取食灭幼脲后,产下的卵在幼虫分化过程中体壁皮细胞受到严重影响。皮细胞变小而扁平,细胞核不明显或无,细胞内含物不饱满。此与龚国玃等(1988)以粘虫等幼虫观察结果一致。既然皮细胞本身受到抑制,理应几丁质前体物(UDPAG)的产生和分泌亦随之受阻。皮细胞内 UDPAG 必须通过膜才能与位于顶膜部位的几丁质合成酶接触,在该种酶的催化作用下聚合成几丁质。如果 UDPAG 的产生及分泌受阻,则灭幼脲对几丁质合成的干扰作用发生在几丁质聚合反应之前。这同 Post 等(1974)及 Deul 等(1978)提出的灭幼脲抑制几丁质合成酶从而干扰几丁质合成的学说不相符合。灭幼脲究竟如何影响皮细胞,尚待深入研究。

二、灭幼脲对核酸及蛋白质的影响

粘虫雌蛾食入灭幼脲后,卵巢中 DNA、RNA 的合成及卵巢对血淋巴中蛋白质的吸

取均被促进。卵巢细胞核中 DNA、RNA 及蛋白质的含量均比正常粘虫增加。卵巢发育及卵子形成亦被促进。胚胎发育不中断, 幼虫分化可达黑头期。说明雌蛾体内 DNA 所受影响并非造成粘虫不育的原因。这和 Mitlin 等(1977)报道的对棉象螂的研究结果有别。棉象螂雌成虫经灭幼脲处理, 整体测定结果表明, DNA 的合成受到了抑制, 而 RNA 及蛋白质都不受影响。棉象螂雌虫体内 DNA 受抑制与卵巢发育及卵子形成的关系尚无研究, 能否确认为不育的原因亦有待判明。

粘虫胚胎发育阶段细胞核及线粒体中 DNA 的含量均因雌蛾取食灭幼脲而降低。但不象烷化剂那样导致胚胎发育的中断。由此认为灭幼脲抑制胚胎期 DNA 亦不是造成卵不孵化的主要原因。然而本实验证明灭幼脲对 DNA 的抑制具有发育阶段和组织的专一性; Soltani 等(1984)认为灭幼脲抑制黄粉蚜蛹腹板皮细胞中的有丝分裂和 DNA 合成。是否灭幼脲在粘虫幼虫分化过程中对皮细胞的 DNA 具有专一性, 从而影响表皮沉积?

三、灭幼脲的保幼激素效应

灭幼脲对某些鳞翅目昆虫具有一定的保幼激素效应 (Salama, 1976)。灭幼脲对粘虫等幼虫表现出保幼激素类似物的效应(龚国玑等, 1988)。本实验证明灭幼脲在粘虫成虫体内亦具有与保幼激素极为相似的生理效应。但此种效应表现在对卵巢发育及卵子形成的促进, 而且不同于用保幼激素或其类似物处理成虫或卵那样导致胚胎发育的中断, 因此与卵不能孵化是无关系的。据 Hoffman (1985) 报道, 已从昆虫卵中分离出四种保幼激素。早期的极可能来自母体, 而后期的可能由胚胎咽侧体所分泌。灭幼脲在卵内是否对激素调节起干扰作用, 从而影响几丁质的合成? 尚有待研究。

综上所述, 灭幼脲的毒理机制是复杂的。但其主要作用还是对几丁质合成的直接抑制。就导致粘虫不育而言, 也是如此。

参 考 文 献

- 毕富春 1983 粘虫的简易人工饲料及防腐剂对其生长发育的影响。昆虫知识 26(6): 260--3。
- 孙少轩、牟吉元 1963 粘虫雌性生殖系统的组织学及卵巢的后胚发育。山东农学院学报 8: 53—68。
- 夏邦颖 1988 核酸和蛋白质等的定量分离和提取。《昆虫学实验技术》, 第 201—203 页。科学出版社。
- 龚国玑等 1988 灭幼脲对小地老虎、粘虫及黄粉甲幼虫内部器官和组织的作用及毒理。昆虫学报 31(4): 358—65。
- Deul, D.H. et al. 1978 Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides II. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 98—105.
- Hoffmann, J.A. et al. 1985 Endocrine aspects of embryonic development in insects. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 1 435—60 Oxford.
- Mitlin, N. et al. 1977 Inhibition of DNA synthesis in boll weevils (*Anthonomus grandis* Boheman) sterilized by dimilin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7:559—63.
- Post, L.C. et al. 1974 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibition of chitin synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4: 473—83.
- Salama H.S. et al. 1976 On the mode of action of dimilin as a moulting inhibitor in some lepidopterous insects. *Z. Angew. Entomol.* 80(4): 396—406.
- Soltani, N. et al. 1984 Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L.: Growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density and DNA synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21: 256—60.

MECHANISM OF CHEMOSTERILIZATION BY DIFLUBENZURON IN ARMYWORM

CHEN PEI GONG HUI-FEN WANG JIN-ZHONG DING JIAN-YUN
(Beijing Agricultural College, Beijing 102208)

WANG ZONG-SHUN
(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Diflubenzuron inhibits reproduction of the armyworm *Mythimna separata* (Walker) when the female moths were fed continuously with sucrose solution containing 50 ppm diflubenzuron. The activity of corpora allata of adults was adversely affected, but the vitellogenin synthesis of fat body, ovarian development and oogenesis could still proceed normally. The levels of DNA, RNA and protein in the cell nuclei of the ovaries were found to increase. However, no larvae would hatch from the eggs. It was observed that treatment of the adults or eggs with diflubenzuron did not influence the general course of embryonic development, but it had detrimental effects on the formation of integument and tracheal system of the developing embryos. The epidermal cells in the integument became flattened, smaller in size, and without nuclei. The procuticle became very thin or vanished. The tracheal trunks could not form and the respiratory function of the embryo could not perform normally. As a result, the embryos would die within the chorion. The DNA level in the nuclei and mitochondria of the embryos was found to decrease. It seems that sterilization in the armyworm may result in part from inhibition of DNA synthesis besides the inhibition of chitin synthesis.

Key words *Mythimna separata* (Walker)—diflubenzuron—ovarian development—embryonic development



1. 正常卵 87 小时, 幼虫体壁分化正常。黑箭头示皮细胞方形, 界限明显, 原表皮均匀, 角质精层整齐。×200 2. 不育卵 87 小时, 幼虫体壁形成受阻。白箭头示皮细胞扁平, 连成线状, 有断裂, 缺乏原表皮, 角质精层色黑不整齐。×200 3, 4. 正常卵 87 小时。黑箭头示气门, 气门气管及侧纵干(已切碎)。×200 5, 6. 正常卵 87 小时, 幼虫气管系统形成。黑箭头示贴近消化道两侧丝腺斜上方的气管纵干。×200 7. 不育卵 87 小时, 幼虫气管系统未形成。白箭头示相应部位无气管。×200

tr 气管 sg 丝腺