

昆虫滞育机制研究进展

梁瀚清¹, 钟杨生¹, 陈芳艳¹, 严会超², 林健荣¹

(1.华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系, 广东 广州 510642;

2.华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 滞育是绝大多数昆虫为了能够在周期性的不利于其生存的自然环境中生存下来而进行的一种生理过程,它在昆虫的生存、进化和繁殖等方面发挥着重要的作用。主要从昆虫滞育发生的原因、影响昆虫滞育的内外因素、内分泌机制、滞育相关酶类、滞育的蛋白质组学和分子生物学、以及有关调控通路研究等方面介绍其研究进展,为今后从种群到个体,从宏观到微观,从激素、酶、关联蛋白三者之间的关系等角度研究和了解昆虫的滞育行为和滞育发生的分子机制提供参考。

关键词: 昆虫; 滞育; 激素; 酶; 蛋白质组学; 信号通路

中图分类号: Q965

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X(2014)20-0084-07

Research progress on insect diapause mechanism

LIANG Han-qing¹, ZHONG Yang-sheng¹, CHEN Fang-yan¹, YAN Hui-chao², LIN Jian-rong¹

(1.Department of Silk Science, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2.State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Diapause is a physiological process for most insects to be existent in a seasonal and adverse natural environment, and it has a very important influence on insects' survival, evolution and propagation, etc. The paper reviewed the reason of diapause, internal and external factors of influence, endocrine mechanisms, diapause related enzymes, proteomics and molecular biology of diapause and research on concerned regulatory pathway, to provide references for researching the relationship among hormones, enzymes and diapause-associated protein and learning the diapause action and molecular mechanism of diapause, from population to individual and from macroscopic to microcosmic.

Key words: insect; diapause; hormone; enzyme; proteomics; signaling pathway

滞育(Diapause)是绝大多数昆虫为了能够在周期性的不利于其生存的自然环境中生存下来而进行的一种生理过程,是昆虫对环境条件长期适应的结果。对昆虫而言,滞育的意义除了能使其安全度过不良环境之外,还能尽可能使其种群发育齐一,极大地增加了雌雄配对的可能性,种群的繁衍因此得到了保证。由此可见,滞育在昆虫的生存、进化和繁殖等方面发挥着重要的作用。昆虫的滞育研究,按照昆虫的发育时期可分为胚胎滞育(卵滞育)、幼虫滞育、蛹滞育和成虫滞育;按

照研究时间的发展顺序可分为个体生态学研究(1900—1920年)、环境生理学研究(1920—1950年)、内分泌学研究(1950—1970年)和分子生物学研究(20世纪80代末至今)^[1]。国内外许多昆虫科学家长期致力于从激素、酶、特异蛋白等方面对昆虫滞育进行研究,为了从分子水平上阐明其机理,近年来进行大量的研究工作,尤其是近年来由于蛋白质组学的兴起,使得对昆虫滞育机制的研究有了新的认识和了解,本文对此进行了归纳和总结,希望能为今后进一步研究昆虫的滞育提供参考。

1 诱导昆虫滞育的因素

1.1 光周期

科学工作者通过对大量的滞育昆虫进行研究后,发现光周期的变化是诱导滞育的最主要因素^[2]。光周期是指在昼夜交替中,光照时间和无光时间的变化周期。光周期现象(photoperiodism)是生物对昼夜光暗交

收稿日期:2014-07-08

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22);国家自然科学基金(31272368);国家公益性行业(农业)科研专项(201403064);广东省自然科学基金(S2011010001893)

作者简介:梁瀚清(1989-),男,在读硕士生,E-mail:hqliang@stu.scau.edu.cn

——通讯作者:林健荣(1953-),男,博士,教授,E-mail:jrlin@scau.edu.cn

替周期的反应。昆虫对光周期的反应有一个临界期,引起昆虫滞育的每日光照时数称为“临界光周期”^[9]。当昆虫通过大脑或者复眼,感受到光周期的变化时,体内的“计时器”就会自动评估白天或者晚上长度,通过调控滞育的相关激素促使昆虫进入滞育^[9]。诱导昆虫滞育的光周期类型有 5 种:(1)短日照(12 h 以下)滞育型,一般是冬季昆虫,如二化螟幼虫^[6];(2)长日照(12 h 以上)滞育型,主要是夏季滞育昆虫,如小麦吸浆虫^[6];(3)中间非滞育型,即除了中间一段较窄的日照外,其他日照长度均诱导了滞育,如桃小食心虫,在温度为 25℃、光照时长短于 12 h 的条件,能够诱导其老熟幼虫全部滞育,而光照 15 h 则基本不滞育,但随着光照时间的继续延长,滞育个体又会大大增加^[7],若光照超过 17 h,则会有 50%以上滞育^[9];(4)中间滞育型,即临界光周期在短日照和长日照之间的,如夜蛾,仅在 12~12.5 h 的光照内即才能被诱导进入滞育^[9];(5)无光周期反应型,即无论对其施加多长的光照时间对其滞育都无影响,如苹果舞毒蛾、丁香天蛾等^[9]。

1.2 温度

研究表明,温度是影响昆虫滞育的另一个重要因素。以昆虫越冬滞育的严格程度来划分,可分为专性滞育和兼性滞育。专性滞育的昆虫在每个世代的一定阶段中,几乎不论环境条件如何,每个个体均无例外地进入滞育,而对兼性滞育的昆虫来说,滞育受环境影响比较明显^[9]。通常与温度有关的滞育大多是由低温诱导的。Numata 等^[10]对位于日本北海道的带广市的新陆原伏蝇的成虫滞育进行了研究,结果显示,当温度为 30℃ 时,无论日照时长如何,都未有成虫滞育的现象发生;但是在 17.5℃ 和 27.5℃ 的低温下,同样无论日照时间长短,成虫的滞育率却很高,这说明该虫的滞育主要是由低温诱导的。Nibouche^[11]对日本棉铃虫的三龄幼虫进行研究,发现,置于 37℃ 下的雄性幼虫中,有 94.7% 进入滞育,雌性幼虫则有 60.9% 进入滞育,这说明有少数昆虫的滞育是由高温诱导的。因此,对于兼性滞育昆虫而言,低温诱导的是冬季滞育,高温诱导的是夏季滞育。

有研究表明,温度在诱导昆虫滞育的过程中还会与光周期结合,共同影响滞育,也就是说,昆虫的临界光周期会随着外界温度的变化而变化。温度大约每升高或降低 5℃,短日照滞育型昆虫的临界光周期就减少或增长 1~1.5 h^[12]。如棉铃虫的幼虫在 20℃、22℃、24℃ 和 26℃ 下滞育的临界光周期分别为 13.72、13.13、12.68、12.12 h;当光照时间在 9~12 h 时,滞育率随着温度(20~24℃)的降低而升高,各温度下,以光照 12 h 滞育率最高,因此,温度低于 24℃、光照 12 h 为诱导棉铃虫滞育的适宜条件^[13]。由此可知,对于短日照滞育型昆

虫来说,低温和短日照结合是诱导短日照滞育型昆虫冬季滞育的原因。

1.3 食物

相较于光周期和温度,食物对昆虫的滞育诱导并不多见,仅在少数昆虫的滞育调控中起到重要作用。在热带地区(如赤道附近),由于光周期和温度的变化范围较小,食物成为影响昆虫滞育的主要条件^[9]。还有一类依赖于季节性食物生存的昆虫,这类昆虫所需的食物随着季节的变化而变化,如当秋冬季来临时,光照时间变短,温度逐渐下降,植物和其他食料减少,导致昆虫取食量减少,体内代谢作用缓慢,逐渐进入滞育^[14]。假若昆虫在极其饥饿的情况下,食用了不适宜的食物或进食不足,也同样会诱导其滞育的发生。有研究发现,七星瓢虫成虫在缺乏食物时,雌虫卵巢的发育就会停止,促使其进入滞育^[9]。

1.4 种群密度

有研究表明,在一些群居性昆虫中,种群密度变化对滞育有显著的诱导作用。如草地螟幼虫的滞育率随着幼虫密度的升高而逐渐增大,当种群密度为 10 头/瓶时,幼虫滞育率仅为 20.8%;而当种群密度达 40 头/瓶时,幼虫滞育率则升至 54.7%^[15]。但是,种群密度的增大势必会导致食物的相对短缺,因此,究竟是种群密度还是食物引起滞育存在分歧,值得进一步研究。

2 昆虫滞育的内分泌学研究

自 20 世纪 50 年代起,许多科学家就开始对昆虫体内与滞育相关的一些重要激素进行了研究,经过半个多世纪的努力,对滞育激素(Diapause hormone, DH)、蜕皮激素(Molting hormone, MH)、保幼激素(Juvenile hormone, JH)、促前胸腺激素(Prothoracictropic hormone, PTTH)等的功能和结构有了深入研究^[16],特别是对滞育激素的研究取得了丰硕的成果^[1, 9];同时,研究人员还通过对这些激素的研究,提出了“神经—激素”和“脑—咽下神经节(Subesophageal ganglion, SG)—滞育激素”两个内分泌系统调控滞育的理论^[1]。

2.1 卵滞育

家蚕(*Bombyx mori*)作为卵滞育的模式昆虫,一直以来都被认为是研究昆虫滞育的重要素材。现在普遍认为,对家蚕滞育的成因与家蚕蛹期由 SG 合成并且分泌的 DH 有关,其具体过程是:分泌至血淋巴中的 DH 与卵巢细胞上的未知受体发生结合,促使卵巢中海藻糖酶(trehalase)基因启动表达,糖元开始积累,之后转化为甘油和山梨醇,从而导致卵在胚胎发育的某一特定阶段停止发育,从而进入滞育^[17]。但是, Katagiri 等^[18]发现,将 trehazolin(一种海藻糖酶抑制剂)和 DH 一起

注入多化性的蚕蛹中,使得卵内糖原含量下降,并且维持在很低的水平,从而导致了母蛾产卵量减半,能孵化的卵大约有 5%,但这些能孵化的卵基本上都是滞育卵。试验结果表明,即使卵内糖原含量很低,也不会影响蚕卵进入滞育,山梨醇和甘油作为碳水化合物的作用也仅仅是增强了蚕卵的抗逆性,即除了普遍认可的糖原、山梨醇代谢调控外,还可以从其他的滞育相关代谢途径来进一步认识和了解家蚕滞育的发生。

2.2 幼虫滞育

关于幼虫滞育的理论,有两种不同的看法:一种认为是激素缺乏诱导了滞育,另一种认为是 JH 的调节导致了滞育的发生。“激素缺乏理论”认为当幼虫的大脑神经(NS)系统活动停止、心侧体(CC)停止分泌脑激素时,滞育现象就发生了;当 NS 系统被激活后,幼虫又开始继续向前发育。“JH 调节理论”认为,由咽侧体(CA)分泌的 JH 通过调节 MH 的分泌来诱导以及维持滞育^[19]。为验证此观点,Yin 等^[20]对西南玉米螟(*Diatraea grandiosella*)幼虫的滞育进行了研究,将刚进入滞育的幼虫颈部结扎,结果发现滞育提前解除,同时还发现,幼虫和蛹的胸腹部发生蜕皮;将 20-羟基蜕皮甾酮(20-hydroxyecdysone, 20E)注入预先结扎了胸腹部的滞育幼虫,结果同样导致其滞育提前解除以及幼虫和蛹蜕皮的发生。导致上述结果的原因是 CA 的分泌物减少,即体内循环的 JH 滴度下降,对 MH 的抑制作用减弱,由前胸腺(PG)分泌的 MH 滴度升高,幼虫滞育提前解除,这表明头部(CA)对于维持滞育来说是十分重要的;而大量向幼虫体内注入 MH 的类似物时,体内循环的 JH 无法对 MH 起到抑制作用,体内 MH 滴度迅速升高,滞育提前解除。研究人员之后还用 JH 对非滞育幼虫进行局部处理,结果导致老熟幼虫也开始滞育,因此,只有在缺少头部(CA)的情况下,MH 才能发挥作用,诱导滞育解除。该研究进一步证明了高滴度的 JH 是维持幼虫滞育的主要原因,JH 滴度的变化可以调控幼虫滞育的启动和维持。

2.3 成虫滞育

成虫滞育实质上是一种生殖滞育,大量研究表明,成虫滞育的主要原因与昆虫体内 JH 滴度的变化密切相关。成虫滞育的研究大多集中在马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)上。将马铃薯甲虫的 CA 摘除后放在诱导非滞育的环境中(长光照,温度适宜),结果发现,甲虫的卵巢停止发育,同时还出现了钻地、飞行肌退化、能量代谢下降等与滞育相关的特征;与此相反的是,如对滞育甲虫注射 JH,则其滞育立即解除,甲虫随即开始寻找食物,卵细胞也开始发育^[21]。

但有人却提出,成虫滞育并不仅仅是由 JH 控制

的。有研究表明,在家蝇(*Musca domestica*)雌性成虫中,分别用 JH 和 20-羟基蜕皮酮处理后,卵巢内卵黄原蛋白 mRNA 分别在 24 h 和 16 h 后开始积累^[22],表明 MH 可能参与成虫滞育的调节。

2.4 蛹滞育

PTTH 的缺乏普遍被认为是导致昆虫蛹滞育的主要原因。蛹体内 PTTH 的滴度偏低,使得 PG 合成和释放 MH 受到抑制,而蛹体内 MH 的滴度大小对蛹滞育的维持与解除起着十分关键的作用,因此,“脑-CA-PG”被认为是控制蛹滞育的功能单位。为了验证此观点,Williams 等^[23-24]对天蚕(*Platysamia cecropia*)的蛹滞育进行了研究,将非滞育蛹的脑或 PG 移植到滞育蛹上,则其滞育解除;如将滞育蛹的 CC 及 CA 摘除,则可以阻止其进入休眠或使滞育的蛹觉醒。

3 昆虫滞育相关酶类的研究

3.1 关键酶

在卵滞育昆虫中,DH 与卵巢上的受体发生结合,能够极大地提高海藻糖酶的活性,因此我们有理由相信,海藻糖酶是 DH 调控代谢过程中的关键酶。经研究表明,海藻糖酶含有 564 个氨基酸,分子量为 64 899^[25]。为了弄清 DH 是否具有活化海藻糖酶的功能以及滞育卵产量的增加与海藻糖酶活性提高是否有关,Su 等^[25-26]将 DH 分别注入正常的蛹体内和摘除 SG 的蛹体内,结果显示,无 SG 的蛹体中,卵巢内的海藻糖酶 mRNA 增加了 7 倍;在正常的蛹体中,卵巢内的海藻糖酶 mRNA 仅增加了 3 倍。以上结果表明,DH 能够通过调控海藻糖酶 mRNA 的转录水平来提高海藻糖酶的活性,最终诱导卵滞育的发生以及滞育卵的增加。

昆虫在进入滞育时,糖元会转化为甘油和山梨醇,甘油和山梨醇具有抗冻剂的作用,能够保护卵组织安全过冬;当滞育解除时,山梨醇会在山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)的作用下转化为糖元,为胚胎的生长发育提供能量,因此山梨醇脱氢酶是滞育解除过程中的关键酶。有研究表明,SDH 的活性随着胚胎滞育的解除而逐步提高,经过测序后,发现 SDH 含有 348 个氨基酸,分子量为 36 000;在对 SDH 转录水平进行研究后,发现将滞育卵进行低温(5℃)处理后,SDH mRNA 的表达量达到峰值,也就是说,当昆虫解除滞育时,卵内具有极大活性的 SDH 会将山梨醇转化为糖元^[27-28]。

3.2 氧化还原酶

滞育并不意味着发育完全停止,而是极其缓慢的向前发育。对昆虫来说,滞育期间体内发生的氧化还原的情况可以作为判断其滞育深浅的一个标准。许多研

究发现,昆虫在滞育过程中,都表现出近乎相同的耗氧量变化规律,即在开始进入滞育时,耗氧量迅速下降;完全进入滞育后,耗氧量略微上升,且整个阶段保持平稳;当滞育解除时,耗氧量开始突增,甚至有些昆虫呈指数倍增长^[29]。因此,对滞育昆虫体内参与氧化还原反应的酶进行研究,可以帮助我们进一步了解滞育的机制。

3.2.1 H₂O₂ 酶 有关研究表明,家蚕滞育卵在滞育发动期间,H₂O₂ 酶(catalase, CAT)活性急剧升高,H₂O₂ 的量显著减少,使得蚕卵内的 O₂ 含量大大减少;当进入滞育期后,H₂O₂ 含量与 CAT 活性都保持极低水平并且变化平缓^[30-31];而侯宜胜等^[32]则发现,在 5℃低温冷藏解除蚕卵滞育过程中,蚕卵 H₂O₂ 含量、CAT mRNA 转录水平和 CAT 活性都显著升高,表明蚕卵在滞育解除的过程中需氧量增加。

3.2.2 谷胱甘肽 S-转移酶 家蚕滞育卵在滞育解除的过程中,高水平的 H₂O₂ 含量却使得胚胎未受到氧化伤害,由此联想到谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)具有修复细胞氧化损伤的作用,故推测:可能是高水平的 GST 活性保证了蚕卵未受到严重的氧化伤害。孟刚等^[33]研究表明,二化性家蚕卵在滞育诱导以及解除阶段,GST 活性经历了极其显著的变化,蚕卵的氧化损伤程度与 GST 活性有十分密切的关系,高水平的 GST 可以有效减少胚胎所受到的氧化损伤。这一结果较好地解释了在 H₂O₂ 含量显著升高的情况下,蚕卵未受到严重氧化伤害的原因。

3.2.3 辅酶 I、II 和其他一些酶类的研究 家蚕作为一种被广泛使用的模式昆虫,对其滞育机制的研究科学家们作了大量工作,目前已明确知道蚕卵在开始进入滞育时卵内耗氧量急剧减少,大量的糖原转化为山梨醇,胚胎细胞分裂变慢,最后在细胞周期的 G2 阶段停止;用浸酸或低温的方法使其滞育解除,其呼吸耗氧量则会显著提高,同时山梨醇重新转换为糖原^[34]。因此,可以通过研究蚕卵内糖原消耗的两条代谢途径,即合成海藻糖途径和糖酵解途径,来进一步探讨家蚕滞育解除的分子机制。

姚金美等^[35]和王启龙等^[36]分别用即时浸酸和低温冷藏的方法处理家蚕滞育卵,结果发现,即时浸酸提高家蚕滞育卵辅酶 I (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)含量与其呼吸耗氧量增加有关,辅酶 II (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP⁺)含量的提高与山梨醇积累抑制无关,而主要与生物合成加强有关;5℃低温处理加强了家蚕滞育卵辅酶 I 合成和再生能力。王启龙等^[37]还对蚕卵滞育开始阶段进行了研究,结果表明,滞育发动期间家蚕滞育卵的辅酶 I 降解速

率加快和辅酶 I 再生速率减慢,共同导致了呼吸耗氧量的下降。以上研究,通过与糖酵解有关酶的活性变化,初步解释了家蚕滞育卵在进入滞育时耗氧量显著降低,以及滞育解除时耗氧量显著上升的原因。

范兰芬等^[38]和王启龙等^[36]还对家蚕滞育卵内乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、苹果酸脱氢酶 (cMDH)、乙酰胆碱酯酶 (acetylcholine esterase, AchE)作了初步研究,结果发现,在滞育卵中,LDH 活性随发育而下降;PK 活性在胚胎发育的前 4 d 呈上升趋势,随后基本保持稳定,即时浸酸显著提高了家蚕滞育卵 PK 和 LDH 活性,而这两种酶又恰恰是糖酵解途径中的关键酶,表明即时浸酸阻止了滞育的发动,同时使得蚕卵呼吸代谢增强;经低温处理后,cMDH 的活性显著增加;在滞育卵产下后 1-7 d, AchE 一直保持较低活性,而在非滞育卵和即时浸酸卵中, AchE 的活性随胚胎的发育逐渐增强。由此推测, AchE 在蚕卵滞育解除后,担负着促进神经信号分子传导的作用。

4 昆虫滞育的蛋白质组学研究

4.1 热激蛋白

人们普遍认为,只有当细胞处于十分不利的环境时,热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs)才会表达,但近年来,越来越多的研究表明,热激蛋白的表达与昆虫滞育之间也存在十分密切的关系。在对不同种类昆虫以及同种昆虫的不同滞育生理阶段进行广泛的研究探索后,人们对热激蛋白 Hsp90、Hsp70、Hsc70 在昆虫滞育期间的表达差异有了一定的了解,并对它们各自的生物功能进行了讨论。

对二化螟 (*Chilo suppressalis*)^[39]、丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*)^[40]的热激蛋白 Hsp90 在滞育期间的表达进行了研究,结果发现都是下调。对家蚕 (*Bombyx mori*)^[41]、欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)^[42]、苹果实蝇 (*Rhagoletis pomonella*)^[42]和烟草天蛾 (*Manduca sexta*)^[42]的热激蛋白 Hsp70 的研究发现,滞育可以诱导该基因的上调表达,但对于蛀茎夜蛾 (*Sesamia nonagrioides*)来说,该基因的表达量却是随着滞育进程而呈现下降的趋势^[43]。

有人根据热激蛋白 Hsp70、Hsc70 和 Hsp90 在竹蠹螟 (*Omphisa fuscidentalis*)滞育进程中的表达情况,推测 Hsp90 可能与滞育维持有关,Hsc70 与滞育解除有关,Hsp70 则与滞育无关^[44];而在蛀茎夜蛾进入滞育的过程中,Hsp70 基因表达量却呈下降趋势。这些研究表明 Hsc70 和 Hsp90 与昆虫的滞育密切相关,其生物功能可能是维持蛋白结构或者活化 MH^[43, 45]。

4.2 差异蛋白

目前,对于差异蛋白的研究方法(分离技术)一般分为两种:一种是双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)分离研究法,另一种是“Shotgun”研究法。后者由于很好地弥补了前者的缺点,同时还具有前者所不具备的优点,因此在蛋白质组学的研究中得到越来越多的重视^[46]。从科研人员对家蚕胚胎发育时期的蛋白质研究进程中,我们可以清晰地看到以上两种技术的在差异蛋白分离及鉴定的使用情况。

颜新培等^[47-48]和钟伯雄等^[49]在家蚕胚胎蛋白质图谱建立之后,继续对家蚕胚胎发育不同时期的基因表达情况进行研究,结果发现胚胎点青期之前的8-9 d内,蛋白质图谱变化不大;但在“点青”到“转青”中,蛋白质图谱发生了巨大的变化,偏酸性蛋白质大量增加;催青前、后期胚胎分别共出现了100和209个差异蛋白,大多蛋白在胚胎发育进入到下一时期时迅速消失,暗示消失的蛋白可能与胚胎的形体特征发育有关。姚国华等^[50]在比较了家蚕人工孵化卵、滞育卵和未受精卵的蛋白质组成后发现,人工孵化卵和滞育卵有4个蛋白的表达量比未受精卵要高出许多;而在人工孵化卵中,有2个蛋白的表达量比滞育卵多5倍以上。赵峰等^[51-52]研究了浸酸卵与未浸酸卵的易溶性蛋白表达差异和滞育卵浸酸前后难溶性蛋白质的表达差异,发现在未浸酸卵和浸酸卵中的特异性蛋白质斑点分别为41和44个;滞育卵浸酸前和浸酸后的特异蛋白分别为31和37个。Fan等^[53]通过对家蚕滞育卵和非滞育卵的进一步研究发现,滞育卵和非滞育卵中的特异蛋白分别为192和253个,其中有24和48个的功能是已知的,表明mRNA在非滞育卵中表达得更多。

科学家也对小麦吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)的滞育进行了类似研究,运用2-DE对小麦红吸浆虫幼虫的不同发育阶段(包括滞育准备期、越夏滞育期、越冬滞育期)提取的蛋白质进行分离和差异分析,结果发现在幼虫的滞育准备期检测到约300个蛋白质点,在其他滞育阶段共检测到275个蛋白质点。通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-associated laser dissociation/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)进行分析,得到幼虫在滞育不同阶段差异最大的8个蛋白质点,使用NCBI nr数据库成功鉴定出其中的7个蛋白,初步了解它们的生物功能,并对这些蛋白质在小麦红吸浆虫滞育过程中的潜在功能进行讨论^[54]。

在昆虫滞育的蛋白质组学的研究中,一定会涉及到滞育关联蛋白(diapause-associated protein, DAP),这是一类与滞育过程关系密切的蛋白的统称。此类蛋白

一般在滞育启动时出现,等到滞育解除时就消失了。西南玉米螟的滞育关联蛋白在脂肪体和血淋巴中含量较高,在滞育准备期出现,在滞育期含量达到最高,而滞育解除后几乎没有^[55]。曾庆礼等^[56]初步推测DAP在昆虫体内可能作为贮藏蛋白或者抗冻蛋白。

4.3 信号通路研究

4.3.1 胰岛素信号通路

众所周知,胰岛素信号通路在调节哺乳动物体内碳水化合物和脂肪的新陈代谢的过程中发挥着重要作用,而对果蝇和线虫的研究表明,这条通路或许能够解释昆虫滞育期间体内物质能量代谢的问题,因此具有十分广阔的研究前景。Hahn等^[57]对秀丽隐杆线虫进行了研究,发现其与大多数滞育昆虫一样,幼虫期(滞育期)体内存在长时间的脂肪储备。几个与线虫体内脂肪维持形成有关的基因,即“永久性幼虫形成(dauer formation, DAF)”基因,被证明是胰岛素信号转导通路基因的直系同源物。

Tatar等^[58]在对果蝇的研究中发现,当胰岛素信号被干扰后,果蝇停止繁殖并且体内的能量储备开始增加,这种生理状态的诱发不禁使人联想到该物种成虫的滞育。JH具有解除果蝇生殖滞育的功能,可通过施加外源JH的方法,使其重新开始生殖发育^[59]。因此,预计胰岛素信号在昆虫能量代谢中起着重要作用,能够解除昆虫滞育,使其继续向前发育。

4.3.2 TOR信号通路

TOR(Target Of Rapamycin)即雷帕霉素靶,是胰岛素信号通路的姐妹通路,能够调节昆虫和脊椎动物的生长发育。在黑腹果蝇体内,脂肪体作为TOR信号,当给幼虫添食氨基酸时,脂肪体能够使TOR活性提高,并且能够促进幼虫生长,目前还不清楚脂肪体使TOR信号增强以及为了调节昆虫的生长、繁殖而提高氨基酸利用率的原因,但有几个脂肪体氨基酸的转运蛋白却与TOR信号的激活有关^[60-61]。TOR在调节生长和繁殖两者之间的关系时发挥着重要的作用:在滞育的准备期,提高昆虫体内的营养物质的利用效率;在滞育解除时,促进昆虫生长发育。同样,其营养调节机制或多或少都能够通过胰岛素信号通路在动态平衡中发挥作用。

5 展望

今后对昆虫滞育机制的研究可以考虑从差异蛋白的分析入手,结合生物信息学的相关分析,通过探究激素、酶、关联蛋白三者之间的关系,来进一步了解昆虫滞育的分子机制。随着世界各国的昆虫学家对其他昆虫滞育机制研究的不断深入,再结合已知的家蚕功能基因组、蛋白质组的最新研究成果和新的实验手段,相信在今后的家蚕滞育研究当中,能够取得更大的成果。

参考文献:

- [1] 徐卫华.昆虫滞育的研究进展[J].昆虫学报, 1999,42(1):100-107.
- [2] 侯月利,花蕾.昆虫滞育诱导的因素[J].陕西林业科技, 2003(3):62-67.
- [3] 农业昆虫学教研组.农业昆虫学原理[M].杨凌:西北农学院, 1972.
- [4] Emerson K J, Bradshaw W E, Holzapfel C M. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause[J]. Trends in Genetics: TIG, 2009,25(5):217-225.
- [5] Xiao H, Mou F, Zhu X, et al. Diapause induction, maintenance and termination in the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker)[J]. Journal of Insect Physiology, 2010,56(11):1558-1564.
- [6] 仵均祥,李长青,李怡萍,等.小麦吸浆虫滞育研究进展[J].昆虫知识, 2004,41(6):499-503.
- [7] 黄可训,王宜智,叶正襄,等.光周期和温度对桃小食心虫滞育的影响[J].昆虫学报, 1976,19(2):149-155.
- [8] 王英.基于 *ea4* 基因结构和表达的家蚕滞育生物钟蛋白质作用机理研究[D].苏州:苏州大学, 2008.
- [9] 刘流,贺莉芳,刘晖,等.昆虫滞育的研究进展[J].安徽农业科学, 2010,38(14):7409-7411.
- [10] Numata H, Shiga S. Induction of adult diapause by photoperiod and temperature in *Protophormia terraenovae* (Diptera: Calliphoridae) in Japan[J]. Environmental Entomology, 1995,24(6):1633-1636.
- [11] Nibouche S. High temperature induced diapause in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1998,87(3):271-274.
- [12] 董宇奎.大猿叶虫不同地理种群的生态适应性和山东种群生物学特性的研究[D].泰安:山东农业大学, 2007.
- [13] 蒋明星,谢立群,张孝羲.棉铃虫的滞育诱导特性[J].应用生态学报, 1999,10(1):60-62.
- [14] 王小平,薛芳森,华爱,等.食料因子对昆虫滞育及滞育后发育的影响[J].江西农业大学学报, 2004,26(1):10-16.
- [15] 谢道松.草地螟滞育影响因子研究及滞育后成虫生物学特性变化[D].武汉:华中农业大学, 2011.
- [16] 徐晶晶,陈斌,郝友进,等.昆虫滞育相关激素调节的研究进展[J].重庆师范大学学报(自然科学版), 2012,29(4):29-33.
- [17] 顾燕燕,华荣胜,时连根.家蚕胚胎滞育的分子机理研究[J].科技通报, 2008,24(6):842-846.
- [18] Katagiri N, Ando O, Yamashita O. Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehalozin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs[J]. Journal of Insect Physiology, 1998,44(12):1205-1212.
- [19] 卓德干,李照会,门兴元,等.昆虫滞育研究进展[J].山东农业科学, 2010(8):86-90.
- [20] Yin C M, Chippendale G M. Juvenile hormone regulation of the larval diapause of the Southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*[J]. Journal of Insect Physiology, 1973,19(12):2403-2420.
- [21] De Kort C A D. Hormonal and metabolic regulation of adult diapause in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Entomologia Generalis, 1981(3):261-271.
- [22] Agui N, Shimada T, Izumi S, et al. Hormonal control of vitellogenin mRNA levels in the male and female housefly, *Musca domestica*[J]. Journal of Insect Physiology, 1991,37(5):383-390.
- [23] Williams C M. Physiology of insect diapause: the role of the brain in the production and termination of pupal dormancy in the giant silkworm, *Platysamia cecropia* [J]. The Biological Bulletin, 1946,90(3):234-243.
- [24] Williams C M. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the *Cecropia* silkworm[J]. The Biological Bulletin, 1952,103(1):120-138.
- [25] Su Z H, Sato Y, Yamashita O. Purification, cDNA cloning and northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1993,1173(2):217-224.
- [26] Ikeda M, Su Z, Saito H, et al. Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone [J]. Journal of Insect Physiology, 1993,39(10):889-895.
- [27] Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. Activity of NAD-sorbitol dehydrogenase is caused by biosynthesis of enzyme protein in diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1992,103(3):657-661.
- [28] Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs[J]. European journal of biochemistry/FEBS, 1993, 213(3):1125-1131.
- [29] Sgolastra F, Bosch J, Molowny-Horas R, et al. Effect of temperature regime on diapause intensity in an adult-wintering Hymenopteran with obligate diapause [J]. Journal of Insect Physiology, 2010,56(2):185-194.
- [30] 赵林川,司马杨虎,李兵,等.即时浸酸对家蚕胚胎发育中 H_2O_2 代谢的影响[J].蚕业科学, 2000,26(4):268-270.
- [31] 沈爱英,赵林川,刘慧婷.外源 H_2O_2 活化家蚕滞育性卵的研究[J].蚕业科学, 2003,29(3):311-313.
- [32] 侯宜胜,王丽,姚金美,等.冷藏期家蚕滞育卵和即时浸酸卵的 H_2O_2 含量及过氧化氢酶基因表达的变化 [J]. 蚕业科学, 2010,36(4):697-701.
- [33] 孟刚,司马杨虎,赵林川.二化性家蚕滞育过程中谷胱甘肽 S-转移酶活性的变化[J].蚕业科学, 2010,36(1):170-174.

- [34] 黄君霆.家蚕滞育分子机制的研究[J].蚕业科学, 2003,29(1): 1-6.
- [35] 姚金美,万华星,司马杨虎,等.即时浸酸显著提高滞育性家蚕卵辅酶 I 和 II 含量[J].昆虫学报, 2012,55(1):24-28.
- [36] 王启龙,万华星,姚金美,等.低温冷藏提高家蚕滞育卵 NAD 含量和胞质苹果酸脱氢酶活性 [J]. 昆虫学报, 2012,55(9): 1031-1036.
- [37] 王启龙,姚金美,司马杨虎,等.二化性家蚕滞育发动期间滞育性卵和非滞育性卵的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸变化[J].蚕业科学, 2013,39(1):47-51.
- [38] 范兰芬,钟杨生,林健荣.家蚕滞育卵与非滞育卵中几种关键酶活性的比较[J].昆虫学报, 2011,54(11):1258-1263.
- [39] Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, et al. Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker [J]. Archives of insect Biochemistry and Physiology, 2006,63(1):36-47.
- [40] Wolschin F, Gadau J. Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*[J]. PloS One, 2009,4(7):e6394.
- [41] Moribe Y, Oka K, Niimi T, et al. Expression of heat shock protein 70a mRNA in *Bombyx mori* diapause eggs [J]. Journal of Insect Physiology, 2010,56(9):1246-1252.
- [42] Rinehart J P, Li A, Yocum G D, et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007,104(27):11130-11137.
- [43] Gkouvtas T, Kontogiannatos D, Kourti A. Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*[J]. Insect Molecular Biology, 2009,18(2): 253-264.
- [44] Tungjitwitayakul J, Tatun N, Singtripop T, et al. Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis* [J]. Zoological Science, 2008,25(3):321-333.
- [45] Gkouvtas T, Kontogiannatos D, Kourti A. Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*[J]. Insect Molecular Biology, 2009,18 (6):759-768.
- [46] Washburn M P, Wolters D, Yates J R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology[J]. Nature Biotechnology, 2001,19(3):242-247.
- [47] 颜新培,钟伯雄,曹家树,等.家蚕催青期胚胎蛋白质图谱的建立[J].蚕业科学, 2004,30(1):28-33.
- [48] 颜新培,钟伯雄,徐孟奎,等.家蚕催青前期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析[J].昆虫学报, 2005,48(2):295-300.
- [49] 钟伯雄,陈金娥,颜新培,等.家蚕催青后期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析[J].昆虫学报, 2005,48(4):637-642.
- [50] 姚国华,钟伯雄,颜新培,等.家蚕胚胎发育关联的初始蛋白质研究[J].蚕业科学, 2004,30(4):436-439.
- [51] 赵峰,林健荣,霍永康,等.家蚕浸酸活化滞育卵早期胚胎发育的难溶性蛋白质差异表达分析[J].中国农业科学, 2008(11): 3933-3940.
- [52] 赵峰,霍永康,林健荣,等.家蚕滞育卵浸酸后易溶性蛋白的表达差异分析[J].蚕业科学, 2008,34(1):54-60.
- [53] Fan L, Lin J, Zhong Y, et al. Shotgun proteomic analysis on the diapause and non-diapause eggs of domesticated silkworm *Bombyx mori*[J]. PloS one, 2013,8(4):e60386.
- [54] Cheng W, Li X, Yu F, et al. Proteomic analysis of prediapause, diapause and post-diapause larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) [J]. European Journal of Entomology, 2009,106(1):29-35.
- [55] Brown J J, Chippendale G M. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*[J]. Insect Biochemistry, 1978,8(5): 359-367.
- [56] 曾庆礼,陈芳艳,张冬燕,等.昆虫滞育及滞育关联蛋白[J].广东蚕业, 2004,38(2):37-41.
- [57] Hahn D A, Denlinger D L. Energetics of insect diapause[J]. Annual Review of Entomology, 2011,56(1):103-121.
- [58] Tatar M, Yin C. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms[J]. Experimental Gerontology, 2001,36(4):723-738.
- [59] Tatar M, Kopelman A, Epstein D, et al. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function[J]. Science, 2001,292(5514):107-110.
- [60] Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, et al. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth[J]. Cell, 2003,114(6): 739-749.
- [61] Geminard C, Rulifson E J, Léopold P. Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*[J]. Cell Metabolism, 2009,10(3):199-207.

(责任编辑 杨贤智)