

# 滞育和非滞育棉铃虫脑的组织解剖学研究<sup>\*</sup>

王方海<sup>1)</sup> 龚 和<sup>2)</sup> 钦俊德<sup>2)</sup> 甘雅玲<sup>2)</sup>

(1) 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; 2) 中国科学院动物研究所)

**摘 要** 滞育和非滞育棉铃虫在不同的发育阶段, 脑的形态组织学结构存在着一定的差异, 主要表现在: 非滞育脑的神经纤维体发达, 神经分泌细胞中的核较大, 且细胞质中除了有线粒体外, 还有大量的粗面内质网及游离的核糖体; 而滞育脑的神经纤维体相对固缩、不发达, 神经分泌细胞中核较小, 细胞质中含有线粒体、光滑内质网和特有的脂滴, 不具粗面内质网. 这些证据表明滞育棉铃虫的脑活性相对较低.

**关键词** 棉铃虫, 滞育, 脑, 组织解剖学

**分类号** Q 964, Q 965

昆虫脑既是神经中枢又是重要的神经内分泌器官, 几乎对昆虫的各种生理活动均起着重要的调控作用. 由于其作为环境信息的直接受体及调节前胸腺和咽侧体的中心, 无疑对昆虫的滞育起着某种调控作用. 在椴天蛾<sup>[1]</sup>、大菜粉蝶<sup>[2, 3]</sup>、烟草天蛾<sup>[4]</sup>等众多的蛹滞育的昆虫中, 经组织学研究, 发现脑的许多神经分泌细胞在滞育期间经历着明显的组织学变化, 且在滞育与非滞育脑之间存在着某些差别, 结合脑摘除<sup>[5, 6]</sup>等研究方法, 现已基本肯定脑在滞育中的作用, 并弄清了脑的某些作用机理. 而有关棉铃虫脑的组织解剖学研究至今未见任何报道, 因此本文从组织解剖学上, 对注定滞育和非滞育棉铃虫的不同发育时期的脑进行了比较研究, 以探索脑在滞育中的作用机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验昆虫

虫源由中国科学院昆虫生态室何忠教授提供, 是采自河南郑州, 在 25℃、光照 16 h/d 的条件下用人工饲料<sup>[7]</sup>饲养繁殖. 非特殊注明外, 滞育的棉铃虫在 20℃、光照 10 h/d 的条件下饲养, 其滞育率可达 100%; 非滞育的棉铃虫在 20℃、光照 16 h/d 的条件下饲养.

### 1.2 脑的活体组织观察

用眼科手术剪刀将幼虫或蛹的头部剪下, 放在载玻片上, 滴加少量生理盐水, 在解剖镜下, 用 2 把尖头镊子夹住头部的两侧, 轻轻撕开头部, 即可见到完整的脑, 将其与周围的组织分开, 立即取出观察, 照相.

\* 农业虫害综合治理国家重点实验室资助项目

收稿日期: 1997-04-18 王方海, 男, 32岁, 博士后

### 1.3 脑的显微和亚显微结构观察

将取出的脑立即用 Susa 液固定, 然后以常规石蜡切片方法制作组织包埋块, 连续切片, 厚度为  $6\mu\text{m}$ , 经苏木精染液 (由 2 g 苏木精、100 mL 纯酒精、100 mL 甘油、10 mL 冰醋酸、2 g 甲明矾、100 mL 蒸馏水配成) 染色或 Mallory 染液 (由 3 g 酸性品红、1 g 苯胺蓝、1 g 橘黄 G、1 g 磷钼酸、200 mL 蒸馏水配成) 三重染色, 在光学显微镜下观察照相; 同时, 将取出的另一部分脑迅速放入 5% 的戊二醛 (用 0.1 mol/L PB 缓冲液二甲胂酸钠溶液, pH 7.4, 配制) 中固定 2 h ( $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ), 用二甲胂酸钠缓冲液浸洗, 再经 1% 的锇酸固定, 二甲胂酸钠缓冲液浸洗、乙醇梯度脱水等步骤后, 用 Epon 812 包埋聚合, 超薄切片 (厚 60 nm), 然后用醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, H-300 透射电镜观察照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 脑的活体组织观察

2.1.1 一般特征 脑可分为左右对称的两半, 脑的形状随着发育时期的不同, 略有变化, 化蛹前即幼虫阶段, 半脑近似椭圆形; 化蛹后, 半脑则接近球形。由前向后可分为前脑、中脑、后脑 3 部分。龄第 2 天, 脑的左右两块的宽度为 1.3 mm 左右, 前脑至后脑的长度大约 1.1 mm 左右。从龄至化蛹后的不同时期的脑来看, 随着年龄的增大, 脑亦随着增大, 至化蛹后 10 d, 脑的体积明显增大, 与龄脑相比, 可达 4 倍多。同时, 随着发育期的不同, 脑颜色也出现明显变化, 龄脑为橘黄色, 龄预蛹颜色逐渐变淡, 刚化蛹时, 脑几近淡白色, 至化蛹后 10 d, 脑几近透明, 颜色特淡。一旦化蛹后, 脑的两边分化出黑色的眼点, 且视叶开始可见, 当化蛹 10 d 后, 视叶体积大大增加, 几与半个脑相近, 此时, 围咽神经节与左右半脑相连, 中间形成明显的围咽神经孔。

2.1.2 不同发育时期注定滞育和非滞育脑的区别 龄幼虫的脑看不出区别, 但龄幼虫的脑可看出: 注定非滞育脑的表面橘红色色素颗粒沉着多且明显, 而注定滞育的脑相对少且不明显。因色素颗粒所存在的部位与某些脑神经分泌细胞分布的区域相对应, 故这些色素颗粒很有可能是神经分泌细胞的分泌物, 由此表明, 龄期间, 注定滞育和非滞育棉铃虫的脑神经分泌细胞的活动存在着某些差异。预蛹时, 可看出注定非滞育脑的组织松散且略显透明, 气管组织发达, 而注定滞育脑的组织致密、不透明, 气管分布相对较少, 由此说明, 在预蛹阶段, 注定滞育棉铃虫的脑活性比注定非滞育棉铃虫的脑活性偏低。

刚化蛹或化蛹 2 d, 由于注定滞育和非滞育的棉铃虫新陈代谢均极其低下, 整个生理活动几乎处于静止状态, 故它们的脑看不出明显区别; 但化蛹 10 d 后, 非滞育棉铃虫的氧耗率增加, 生理活动逐渐旺盛, 很快就要进入到预成虫阶段, 而滞育棉铃虫已处于滞育状态, 新陈代谢几乎降到最低水平, 因此从形态上发现滞育和非滞育棉铃虫的脑出现了明显区别, 非滞育脑组织较松散, 透明度相对较高, 特别是体积明显比滞育的增大。

### 2.2 光镜观察

将不同时期的注定滞育和非滞育棉铃虫脑制成石蜡切片, 经苏木精或 Mallory 三重染色, 在光学显微镜下观察, 结果如图 1。

2.2.1 一般特征 经 Mallory 染色, 脑的剖面可区分出染色结果完全不一样的皮层和髓层, 皮层整体颜色偏红, 含有形形色色的神经分泌细胞, 根据染色的不同, 可分出 A、B、C 3 种细胞。髓层颜色偏蓝, 位于脑的中央, 由成束的神经纤维束和神经纤维球组成, 形成

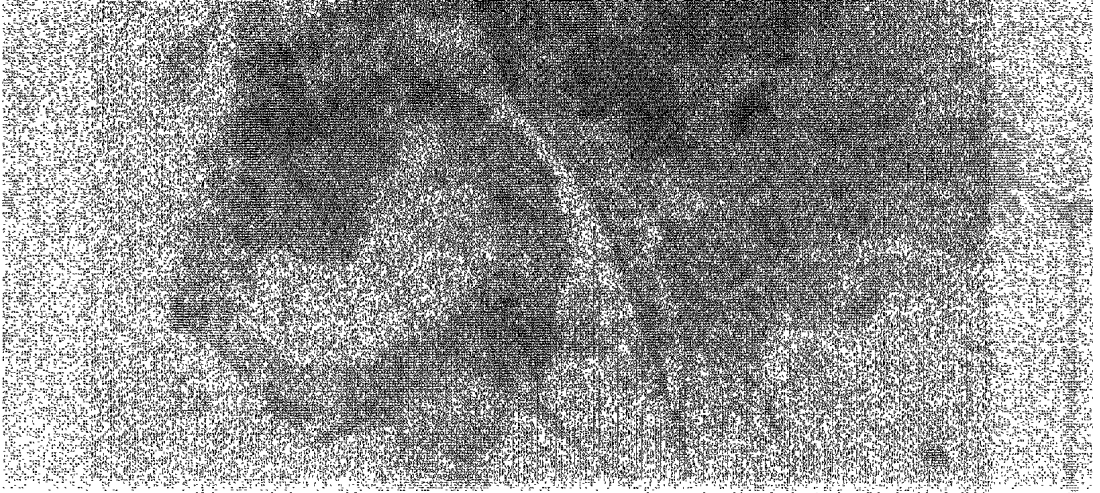


图 1 注定滞育和非滞育棉铃虫在不同发育时期的脑的石蜡切片图

Fig. 1 Paraffin sections of the brains of diapause- and non-diapause-destined

*H. armigera* during different developmental stages

A, B 注定非滞育 (A)和注定滞育 (B)棉铃虫 (龄第 2 天幼虫脑的石蜡切片图, 苏木精染色  $\times 50$ ); C, D 注定非滞育 (C)和注定滞育 (D)棉铃虫预蛹第 2 天脑的石蜡切片图, Mallory 染色  $\times 33$ ); E 注定非滞育棉铃虫化蛹第 2 天脑的石蜡切片图, Mallory 染色  $\times 66$ ); F 注定滞育棉铃虫化蛹第 2 天脑的石蜡切片图, Mallory 染色  $\times 100$ ); G 注定非滞育棉铃虫化蛹第 10 天脑的石蜡切片图, 苏木精染色  $\times 50$ ); H 注定滞育棉铃虫化蛹第 10 天脑的石蜡切片图, Mallory 染色  $\times 50$ )

若干脑体和神经纤维体, 随着虫龄的增大, 脑髓层变得越来越发达, 脑的外面被染成蓝色的神经膜所包裹, 整个神经膜可明显区分出两层, 外层颜色较深, 里层颜色较淡。

种神经分泌细胞的主要特点如下: A 细胞较大, 细胞质内充满嗜酸性复红颗粒, 细胞质紫红色, 核内染色质淡紫色, 核仁深紫色; B 细胞圆形, 小于 A 细胞, 细胞质淡红色, 核内染色质橙红色, 核仁紫红色; C 细胞大小极不一致, 且形状不定, 有椭圆形, 三角形, 长方形等, 细胞质浅蓝色, 核内染色质紫红色, 核仁紫黑色。

2.2.2 不同发育时期注定滞育和非滞育棉铃虫脑的区别 从总体来看, 注定滞育与非滞育脑相比, 主要区别① 无论是 (龄、预蛹、化蛹后 1 d 或 10 d, 非滞育脑的神经纤维体发达, 滞育脑的神经纤维体相对固缩、不发达; ② 将预蛹和化蛹后 1 d 的注定滞育和非滞育脑用 Mallory 三重染色, 发现整体水平的颜色有较大差别, 注定非滞育脑的神经分泌细胞可能活动旺盛, 分泌出大量的嗜酸性复红颗粒, 从而使颜色偏红, 而注定滞育脑颜色偏蓝。

### 2.3 电镜观察

将化蛹 10 d 后的滞育和非滞育棉铃虫蛹脑固定, 做成超薄切片, 透射电镜下观察, 结果如图 2。

非滞育蛹脑的神经分泌细胞: 细胞核较大, 成圆形或椭圆形, 位于细胞体中央, 核膜

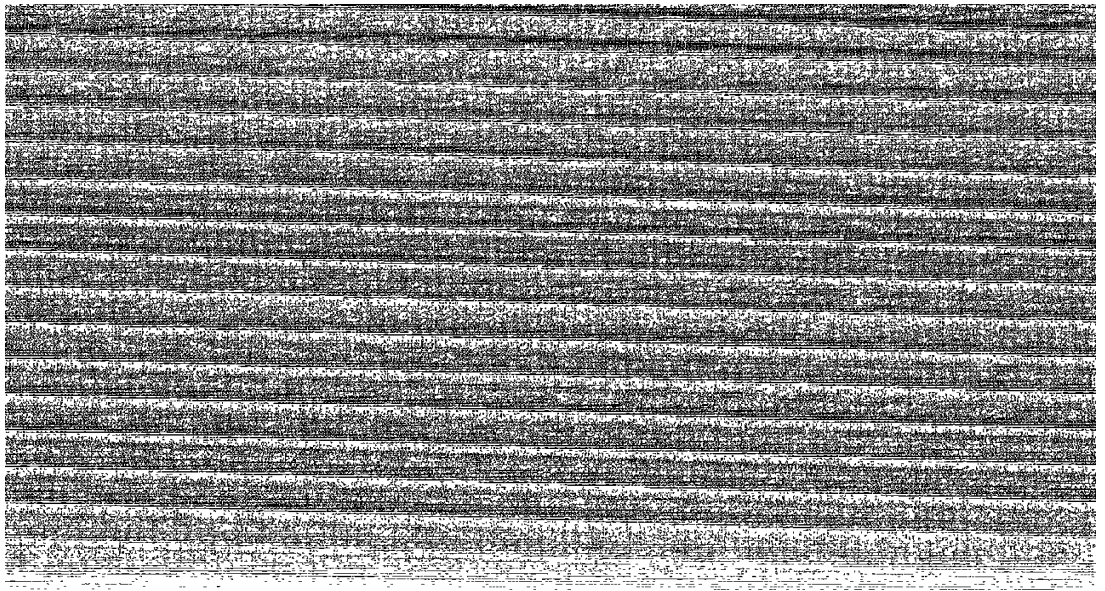


图 2 滞育和非滞育棉铃虫脑的电镜观察图

Fig. 2 Thin sections of the brains of diapause- and non-diapause *H. armigera*

A, B 非滞育棉铃虫脑的电镜观察图, 分别示神经分泌细胞的超微结构 ( $\times 15\ 000$ ) 和神经轴突结构 ( $\times 5\ 000$ ); C, D 滞育蛹脑的电镜观察图, 放大倍数分别为 7 000 和 10 000 倍图中可看到明显的脂滴, 线粒体和光滑内质网, 但不具粗面内质网

有 2 层, 有许多物质穿过核膜进入细胞质, 物质交换比较频繁, 核内异染色质比较分散. 细胞质中有椭圆形的线粒体和大量的粗面内质网及游离的核糖体. 轴突横切面不规则, 鞘壁较薄, 由双层膜鞘组成. 轴突内除了有轴突小泡外, 还有大量的神经分泌颗粒, 这些颗粒在电子致密度上相当一致, 一般为 200~ 300 nm.

滞育蛹脑的神经分泌细胞: 含有脂滴, 线粒体和光滑内质网, 不具粗面内质网, 由于具有大量的电子致密度较高的内含物, 使得图象模糊, 细胞器轮廓不清.

### 3 讨 论

活体组织、显微和亚显微 3 个不同层次的观察, 发现滞育与非滞育棉铃虫蛹及其早期阶段 (如 6 龄, 预蛹) 的脑均存在着某些差异, 这些差异从不同的角度说明滞育棉铃虫的脑活性在 6 龄至蛹期的不同发育阶段均低于对应的非滞育棉铃虫, 因此滞育与非滞育棉铃虫在不同的发育阶段, 其脑神经分泌细胞很有可能经历着不同的变化, 从而对靶器官产生不同的调控作用, 最终导致滞育与非滞育现象的产生.

在烟草天蛾中, Agui<sup>[8]</sup>已经鉴定出 PTH 由 2 个侧神经分泌细胞中的 1 个合成和释放, 从而说明在众多的神经分泌细胞中可能有极少数细胞与 PTH 的合成有关. 由于蛹滞育昆虫中, 脑主要通过控制 PTH 的合成和释放对滞育产生调控作用, 因此弄清具体合成 PTH 的神经分泌细胞对于了解脑在滞育中的调控作用将有很大的帮助. 在本实验中, 根据染色的不同, 将棉铃虫的脑神经分泌细胞分为 2 种不同的类型, 至于其中那一类或者那一类

中的某一或几个神经分泌细胞与 PTH 的合成和释放有关, 则还不清楚, 有待于进一步研究.

### 参 考 文 献

- 1 Highnam K C. Activity of the brain/corpora cardiaca system during pupal diapause 'break' in *Mimastiliae* (Lepidoptera). *Quart J Mic Sci*, 1958, 99: 73~ 88
- 2 Kind T V. The dynamics of the brain endocrine activity in the active and diapause pupae of *Barathra brassicae*. *Zool Zh (a)*, 1977, 56: 386~ 399
- 3 Kind T V. Dynamics of the brain endocrine activity under the reactivation of the *Barathra brassicae* diapausing pupae and subsequent imaginal development. *Zool Zh (b)*, 1977, 56: 881~ 893
- 4 Borg T K, Bell R A. Ultrastructure of the neurosecretory cells in the brain of the diapausing pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Tissue Cell*, 1977 (5): 567~ 574
- 5 Browning T. Ecdysteroids and diapause in pupae of *Heliothis punctiger*. *J Insect Physiol*, 1981, 27: 715~ 719
- 6 Safrane K L, Williams C M. Studies on the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biol Bull*, 1980, 158: 141~ 153
- 7 吴坤君. 棉铃虫的紫云英麦胚人工饲料. *昆虫学报*, 1985, 28: 22~ 29
- 8 Agui N, Granger N A, Gilbert L I, et al. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone in vitro assay of a single neurosecretory cell. *Proc Nat Acad Sci*, 1979, 76: 5694~ 5698

## The Brain Morphology of Diapause- and Non-Diapause-Destined *Helicoverpa armigera*

Wang Fanghai\* Gong He Qin Junde Gan Yaling

**Abstract** In different developmental stages, there are some differences in the morphology of brain between diapause- and non-diapause-destined *H. armigera*. In the non-diapause active brains, there is a much greater volume of neural fibril body, the neurosecretory cells have bigger nuclei and their cytoplasm contain an abundance of rough endoplasmic reticulum and free ribosomes. In diapause inactive brains, there is smaller volume of neural fibril body, the neurosecretory cells have small nuclei and their cytoplasm contain smooth endoplasmic reticulum and some lipid droplet, few rough endoplasmic reticulum.

**Keywords** *Helicoverpa armigera*, diapause, brain, morphology

\* State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275