

葱蝇的实验室饲养、生物学特性及滞育诱导*

陈斌,黎万顺,冯国忠,何正波,李廷景

(重庆师范大学 生命科学学院 昆虫与分子生物学研究所 重庆高校生物活性物质工程研究中心
重庆高校动物生物学重点实验室,重庆 400047)

摘要 葱蝇是昆虫滞育分子机理、滞育期抗逆基因、冬滞育和夏滞育专化基因比较等研究的理想模式种,为开展昆虫滞育分子机理及抗逆基因研究,从日本引进葱蝇并设计了葱蝇的培养笼,首次在国内建立了稳定的实验室种群。基于早前的研究工作基础,对葱蝇最佳食物、人工饲养技术和条件、冬滞育和夏滞育诱导和终止条件作了进一步研究;并对各虫期、冬滞育和夏滞育期的生理和生物学特性作了进一步观察,成功地获得了供分子生物学研究需要的非滞育、冬滞育和夏滞育葱蝇各发育阶段的样品。特别重要的是,在本研究通过适度提高光照强度可以使所有实验蝇进入夏滞育。因此,本实验室能够获得100%的冬滞育和夏滞育蝇。本文报道和总结葱蝇的实验室饲养技术、各虫态主要生物学特性,以及冬滞育和夏滞育的诱导和终止策略。

关键词 葱蝇;实验室饲养;人工饲料;生物学特性;滞育诱导

中图分类号 :Q969.454.1 S433.89

文献标识码 :A

文章编号 :1672-6693(2010)02-0009-05

葱蝇(*Delia antiqua*)是双翅目(Diptera)、花蝇科(Anthomyiidae)、地种蝇属(*Delia*)昆虫,广泛分布于亚洲、欧洲和北美^[1]。在国内如青海、新疆、内蒙古、陕西、山西、甘肃、宁夏、辽宁、河北、北京、河南、江苏、山东等省(市、自治区)也有其相关报道。作为北半球温带地区百合科蔬菜上发生的最重要害虫之一^[2-3],其幼虫钻入鳞茎内取食,形成孔洞,引起腐烂,导致受害植株叶片枯黄,凋萎死亡^[3-4]。其每年发生2~4代^[3],对百合科蔬菜产品的产量和质量影响极大。

滞育(Diapause)是昆虫及其近缘节肢动物在特定发育期发育停滞,不食不动,新陈代谢降低的一个生命现象。认知昆虫滞育及其调控的分子机理,是认知昆虫物候学及季节分布模式的中心。滞育发育的标志基因可用于害虫发育状态监测,确定最佳控制时期。敲除害虫的滞育发育基因,使害虫不能正常地完成滞育,从而达到害虫控制的目的。同时,认知昆虫滞育的分子机理可以认知整个有机体和细胞发育停滞和再开始的调控机理,是研究生物老化分

子机理的重要手段。滞育期的抗逆基因,包括抗寒、耐热、抗干旱、抗菌和免疫基因,对农业和医学基因工程具有重要应用价值^[5-6]。许多昆虫具有冬滞育(Winter diapause)和夏滞育(Summer diapause),然而仅知葱蝇和甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)等很少几个种的这两种滞育出现在同一发育期^[5-7]。葱蝇这两种滞育出现在蛹期头外翻后的同一发育点,在系统发育上,葱蝇与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)近缘^[5]。因此,它是这两种滞育专化基因比较研究的理想模式种。

Ishikawa利用人工饲料成功实现了葱蝇的实验室饲养^[8]。随后,其研究团队对葱蝇的生物学、滞育的诱导条件、温度和光周期对滞育的影响作了大量研究^[9-12]。笔者受日本东京大学客座教授基金资助,以葱蝇为模式种,在国际上首次建立了一个昆虫冬滞育和夏滞育比较研究的模式动物系统,在分子水平上系统筛选并揭示了冬滞育和夏滞育不同发育期的专化基因,在超低温和高温条件下的抗寒、耐热及免疫基因,发现了*DaTrypsin*、*Dadesat*和*DaTCP-1*等3个滞育

* 收稿日期 2009-07-20

资助项目 国家自然科学基金(No. 30870340);重庆市自然科学基金重点项目(No. CSTC2008BA5030);重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB1365)

作者简介 陈斌,男,教授,博士,巴渝学者特聘教授,重庆市昆虫学会理事长,研究方向为昆虫分子生物学。

相关新基因,并对这 3 个基因以及 *HSP90*、*HSP70* 和 *Phospholipids* 等基因作了深入研究,包括基因克隆、结构、表达、进化、功能预测等^[5-6,13-17]。此外,葱蝇蛹期 cDNA 文库的构建已经完成^[18]。

虽然过去在日本已有葱蝇的实验室饲养技术及滞育诱导条件研究,但对饲养及滞育诱导条件进行系统总结和优化未见报道。国内商品化的、可用于昆虫饲养的食品种类不同,有必要进行新的探索。出于昆虫滞育分子机理及抗逆基因研究的需要,2008 年 5 月,笔者所主持的研究组从日本引进了葱蝇实验室种群,利用人工饲料进行实验室人工饲养和连续传代。1 年多来,通过对葱蝇的最佳食物、人工饲养技术、饲养条件、冬滞育和夏滞育的诱导和终止条件不断摸索,并对其生理和生物学特性进行了进一步研究,现已建立了稳定的实验室种群,从而满足本研究组开展分子生物学研究的需要。本文在此报道和总结了葱蝇的实验室饲养技术、生物学习性和滞育诱导条件。

1 葱蝇虫源和培养箱

葱蝇起始采自日本札幌(Sapporo)北海道国家农业试验站(Hokaido national agricultural experiment station)的野生种群,其后在日本东京大学应用昆虫学实验室饲养了 40 余代,本实验种群的虫源来自于该实验室的实验种群。

葱蝇的饲养及滞育诱导需要各型气候培养箱。本实验室所用培养箱除微机人工气候箱(GC250H)购自上海悦丰仪器仪表有限公司外,其余培养箱如人工气候箱(SHH-250GSP)、低温生化培养箱(SHH-150P)和低温保存箱(SHH-70MD)均购自重庆永生仪器厂。

2 葱蝇的饲养及生物学习性

2.1 成虫的饲养及产卵习性

成虫饲养于本实验室设计加工的成虫饲养笼内。该笼为 30 cm × 30 cm × 30 cm 的木构架笼。其底板和为木板,一侧为透明玻璃,其中央留有一个直径 12 cm 的袖孔便于取放虫体,其余各面均为透气、透光良好的纱布。饲养笼放置于光温湿控制的人工气候箱内。成虫饲养温度(23 ± 1) °C,光周期为 16 h 光照: 8 h 黑暗(16L: 8D),相对湿度 50% ~ 70%^[10]。约 300 个蛹用培养皿盛放并置于饲养笼

内。待蛹羽化时,用培养皿分别盛放酵母粉和蔗糖粉于饲养笼内作为成虫的食物,置填棉花和清水的水杯于饲养笼内补给成虫水源。待成虫开始产卵时,放入一个直径 110 mm、高 50 mm 的塑料盒供成虫产卵用。产卵盒内装湿润粗砂或小玻璃珠,表面放几片新鲜洋葱诱导成虫产卵。饲养期间保持饲养笼及周围环境清洁。

在上述环境条件下,基于 510 个新羽化成虫的观察,发现 49% 的成虫能存活 19 d,26% 的成虫能存活 24 d,2% 的成虫能存活 35 d。成虫羽化后第 8 d 开始产卵,第 31 d 产卵基本结束,每天产卵量的变化幅度较大,产卵主要集中在羽化后第 10 ~ 21 d (图 1)。平均每只雌虫产 146 个卵,其中的 49 个能成功地发育至蛹。卵的平均孵化率和化蛹率分别为 50% 和 33.40%,在羽化后第 8 ~ 22 d 成虫所产卵的化蛹率较高,但第 23、24 d 成虫所产卵的化蛹率分别急剧下降至 11.85%、2.20%,第 25 d 及其后成虫所产卵不能化蛹。

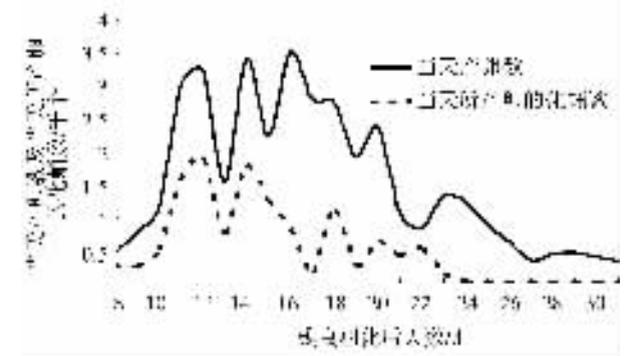


图 1 葱蝇成虫产卵期的日产卵量及卵的化蛹数

Fig. 1 Ovipositional quantity each day during ovipositional period of adults of onion fly and pupation quantity from the daily oviposition

2.2 卵和幼虫的饲养及幼虫习性

幼虫人工饲料的配方见表 1。配制时将表 1 中的氯霉素单独溶于少量酒精中,硫酸新霉素单独溶于 10 mL 水中,氯化胆碱和维生素 C 混合溶于 15 mL 水中。将表 1 中的鼠饲料、脱脂大豆蛋白粉、纤维素粉、蔗糖、琼脂粉、酵母粉、对羟基苯甲酸甲酯按量混合盛放于 20 cm × 14 cm × 5 cm 的金属容器里,加 750 mL 水搅拌均匀,蒸 45 min,取出冷却至 60 °C 左右。然后加入事先准备好的氯霉素、硫酸新霉素、氯化胆碱和维生素溶液,搅拌均匀,冷却后放入 4 °C 冰箱保存。使用前,将人工饲料切成厚度约

为 3 cm × 4 cm × 1 cm 的薄片投喂。

表 1 葱蝇幼虫人工饲料配方

Tab. 1 The recipe of artificial diet for the larvae of onion fly

| 成份 | 用量/g | 生产/销售商 |
|----------|------|--------------|
| 鼠饲料 | 48 | 重庆滕鑫公司 |
| 脱脂大豆蛋白粉 | 56 | 广东保瑞药业有限公司 |
| 纤维素粉 | 40 | 康宝莱保健品有限公司 |
| 蔗糖 | 16 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 琼脂粉 | 16 | 北京鼎国生物技术有限公司 |
| 酵母粉 | 16 | 北京鼎国生物技术有限公司 |
| 对羟基苯甲酸甲酯 | 2.4 | 成都市科龙化工试剂厂 |
| 氯霉素 | 0.6 | 北京鼎国生物技术有限公司 |
| 硫酸新霉素 | 0.6 | 北京鼎国生物技术有限公司 |
| 氯化胆碱 | 1.2 | 成都市科龙化工试剂厂 |
| 维生素 C | 1.2 | 北京鼎国生物技术有限公司 |

每天收集新鲜虫卵。用细筛从产卵盒筛出卵至黑底的 A4 纸上。用湿润的排笔蘸取 700 ~ 800 个卵,并接种到一片人工饲料上,在接种卵的食物一面上方加放另一片人工饲料后,转放入幼虫饲养盒。幼虫饲养盒为直径 160 mm、高 60 mm 的塑料盒,底部放入 1 ~ 2 cm 厚的湿润细沙。细沙的湿度需要在合适的范围内,湿度过小影响幼虫正常生长,过大微生物生长旺盛,致使饲料腐败加速。定时观察,待幼虫孵出后按需求添加新鲜饲料同时清除已腐败的饲料,直至化蛹完成。幼虫数量不能太多,否则会影响幼虫生长的实际温度和幼虫摄食的同步性,从而影响化蛹的同步性和蛹的质量。要保持盒内清洁,否则影响幼虫的正常生长,甚至影响存活率。幼虫饲养条件见图 2A,在此温度条件下,卵期约为 3 d,幼虫期约为 14 d(3 龄)。

老熟幼虫(第 3 龄末期)会停止摄食,寻找适合的沙土环境潜入地下,之后收缩身体,停止活动,环境不合适会使其延迟化蛹甚至不化蛹。化蛹时,口沟向背面折回,身体长度收缩到原来的约 70%,变粗,体外迅速包裹一层透明物质(而后形成蛹壳)。幼虫在透明外壳包裹没有完成之前,若被外力打扰暴露在光线下,会重新变回幼虫状态,迅速利用口沟钻回合适的沙土中,重新完成化蛹过程,蛹壳包裹完成后就不再可逆。刚形成的蛹,蛹壳未硬化,在弱光下幼虫口器会不停的摆动,甚至虫体摆动,移动身体,来躲避光线。

2.3 蛹的饲养及习性

实验用蛹须每日采集。采集时,把自来水温度调至幼虫饲养温度,加入幼虫饲养盒内轻轻搅动,然

后用网筛过滤和分离出幼虫和蛹。把分离出的幼虫放入一个具湿润细沙和食物的新幼虫饲养盒内。化蛹 3 h 内的蛹呈白色或浅橙色,可较准确推算化蛹发生时间,是较理想的实验用蛹,颜色较深的蛹则用于保持实验种群。对每批 150 个、共 3 批头外翻期后发育正常的蛹(化蛹后 5 ~ 10 d)进行称重,得平均蛹重 17.56 mg。把采集到的蛹放于直径 55 mm、高 12 mm 塑料培养皿内,培养皿底部放置湿润滤纸,培养皿用 Milli Wrap 胶带密封以防蛹脱水。非滞育蛹饲养在温度(20 ± 0.2) °C,光周期 16L: 8D,相对湿度 50% ~ 70% 的条件见图 2A,在此环境条件下,蛹期约 18 d。

初蛹呈白色,随后从前、后两端开始颜色加深。其先后顺序是:前、后端的气孔,其次鳃盖前,最后由两端向中间延伸。3 ~ 5 d 龄的蛹(头外翻后)可冷藏存储在 4 °C 的无光冷藏柜中,在此条件下保存 6 个月蛹的存活率无明显减少。当储存期超过 6 个月,成虫羽化率会逐渐降低。不过,储存期超过 1 年的蛹存活率也相当可观^[11]。

3 葱蝇滞育的人工诱导及其特性

适当的环境条件可诱导葱蝇进入冬滞育或夏滞育。葱蝇蛹期头外翻出现在蛹期大约 11.5% 的有效积温完成点。一旦头外翻,蛹的形态已完全形成,具备抵抗外界不良环境条件的物质基础。冬滞育和夏滞育都出现在大约 15% 的有效积温完成点,即同一生理发育时间点。光照和温度都是诱导葱蝇进入滞育的关键因素,短日照和低温诱导葱蝇进入冬滞育,长日照和高温诱导夏滞育。

3.1 冬滞育的诱导及其特性

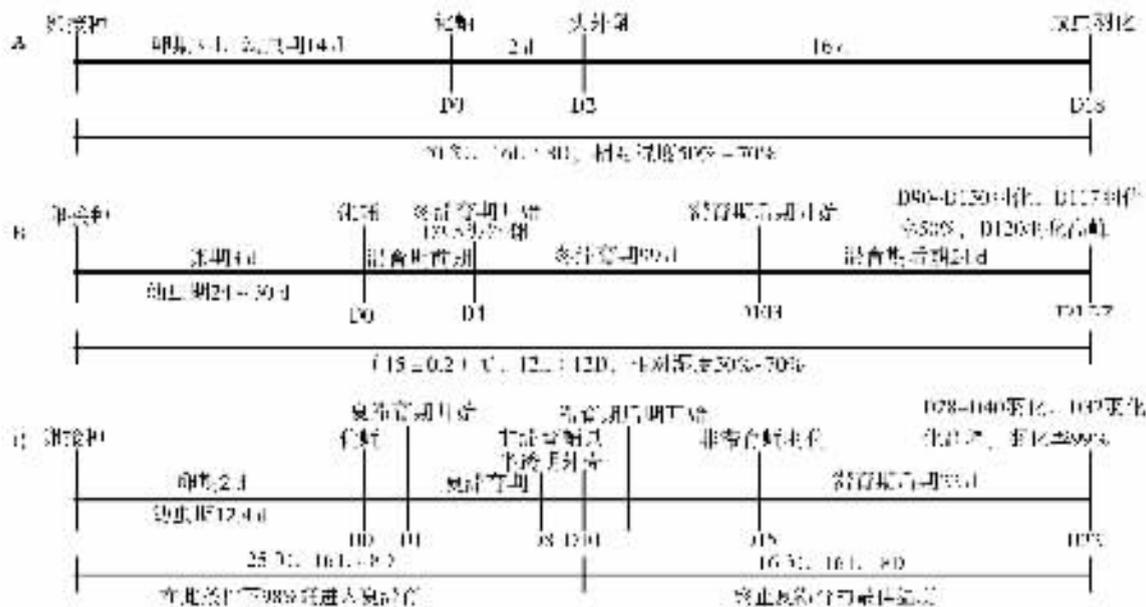
从卵期到蛹期,把葱蝇置于图 2B 所示条件下,几乎 100% 的蛹都能被诱导进入冬滞育^[10],这与当前及以前的研究基本吻合^[6,15,17]。在此条件下,卵期约为 3 d,幼虫期 24 ~ 30 d,滞育期前期(Pre-diapause,化蛹至头外翻)约 4 d,冬滞育期约 99 d,滞育期后期(Post-diapause,滞育结束至成虫羽化)约 24 d^[10]。成虫羽化主要出现在化蛹后的第 90 ~ 150 d,第 117 d 羽化率达到 50%,第 120 d 是羽化高峰^[10]。冬滞育期具有两个对温度敏感性有差异的阶段。在前一阶段,5.6 °C 低温对滞育发育没有影响,在后一阶段,滞育发育随 5.6 °C 低温处理的时间长短成比例延后,这两个阶段的转折点在化蛹后的第 60 d^[10]。进入冬滞育的蛹,平均蛹重 19.02 mg,明显重于非

滞育蛹。

3.2 夏滞育的诱导及其特性

在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光周期 16L: 8D 和相对湿度 50% ~ 70% 的条件下饲养卵、幼虫和蛹期 95% 以上的蛹进入夏滞育。少量未进入夏滞育的蛹在化蛹后第 8 d 蛹壳呈半透明状,通过灯光透射检查可以区分并排除非滞育蛹^[12]。这与当前及以前的研究基本吻合^[6,15,17]。在此条件下,卵期约为 2 d,幼虫期 12.4 d,滞育期前期约 1 d。 16°C 是夏滞育发育的

最佳温度,在此温度条件下,夏滞育很快终止进入滞育期后期(图 2C)。在 16°C ,滞育期后期约 22 d。进入夏滞育的蛹,平均蛹重 17.80 mg,略重于非滞育蛹。夏滞育诱导对温度最敏感的阶段处于预蛹形成(Pupariation)和蛹形成(Pupation,头外翻时)之间的发育期^[11]。本研究表明此时期蛹对光照强度也非常敏感,适度提高光照强度可以使所有蛹进入夏滞育。光照强度对滞育诱导的影响尚需要进一步研究。



A: 非滞育; B: 冬滞育; C: 夏滞育; D0: 开始化蛹后的第 0 d; D2: 化蛹后的第 2 d, 其余以此类推。

图 2 葱蝇的发育历期及滞育诱导

Fig. 2 Developmental durations and diapause inductions of onion maggot

致谢:感谢日本东京大学 Ishikawa 教授馈赠葱蝇虫源,据此笔者才得以建立自己的实验室品系。

参考文献:

[1] 滕学强,何振昌. 葱蝇生物学特性的观察研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1989, 20(2): 89-94.

[2] Poprawski T V, Robert P H, Maniania N K. Susceptibility of the onion maggot to the mycotoxin destrone [J]. Appl Ent Zool, 1985, 20(70): 801-802.

[3] 张云霞,薛明,宋增明. 葱蝇 *Delia antiqua* (Meigen) 的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(3): 455-458.

[4] 王永卫,徐继明. 葱蝇的发生及防治[J]. 新疆农垦技术, 1990(3): 17-18.

[5] Chen B, Monteiro A, Kayukawa T, et al. Molecular analysis of diapause and thermal-stress response in the onion maggot *Delia antiqua* [J]. Entom Res, 2007, 37(Suppl): 19-

20.

[6] Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, et al. Cloning and characterization of the *HSP70* gene and its expression in response to diapause and thermal stress in the onion maggot *Delia antiqua* [J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39: 749-758.

[7] Kimura Y, Masaki S. Effect of light period on dark-time measurement for diapause induction in mamestra brassicae [J]. J Insect Physiol, 1992, 38: 681-686.

[8] Ishikawa Y, Mochizuki A, Ikeshoji T, et al. Platura (Diptera: anthomyiidae) on an artificial diet with antibiotics [J]. Appl Entomol Zool, 1983, 18: 62-69.

[9] Ishikawa Y, Tsukada T. Effect of temperature and photoperiod on the larval development and diapause induction in the onion fly *Hylemya antiqua* meigen (Diptera: anthomyiidae) [J]. Appl Entomol Zool, 1987, 22: 610-617.

[10] Nomura M, Ishikawa Y. Biphasic effect of low temperature on completion of winter diapause in the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. J Insect Physiol, 2000, 46: 373-377.

- [11] Ishikawa Y , Yamashita T , Nomura M. Characteristics of summer diapause in the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera : Anthomyiidae) [J]. J Insect Physiol 2000 , 46 : 161-167.
- [12] Nomura M , Ishikawa Y. Dynamic changes in cold hardiness , high-temperature tolerance and trehalose content in the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera : Anthomyiidae) , associated with the summer and winter diapause [J]. Appl Entomol Zool 2001 , 36 : 443-449.
- [13] Kayukawa T , Chen B , Hoshizaki S et al. Upregulation of a desaturase is associated with the enhancement of cold hardiness in the onion maggot *Delia antiqua* [J]. Insect Biochem Mol Biol 2007 , 37 : 1160-1167.
- [14] Miyazaki S , Kayukawa T , Chen B , et al. Enhancement of cold hardiness by acclimation occurs stage-specifically in the non-diapausing pupae of onion maggot *Delia antiqua* [J]. European J Ent 2006 , 103 : 691-694.
- [15] Chen B , Kayukawa T , Monteiro A , et al. The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot *Delia antiqua* [J]. Insect Mol Biol 2005 , 14 : 697-702.
- [16] Kayukawa T , Chen B , Miyazaki S et al. expression of messenger ribonucleic acid for the t-complex polypeptide-1 , a subunit of chaperonin CCT , is upregulated in association with increased cold hardiness in *Delia antiqua* [J]. Cell Stress Chap 2005 , 10 : 204-210.
- [17] Chen B , Kayukawa T , Jiang H B , et al. DaTrypsin , a novel clip-domain serine proteinase gene upregulated during winter and summer diapauses of the onion maggot *Delia antiqua* [J]. Gene 2005 , 347 : 115-123.
- [18] 黎万顺 , 陈斌 , 冯国忠 , 李廷景. 葱蝇非滞育蛹的全长 cDNA 文库的构建 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版) 2010 , 27(1) : 21-25.

Animal Sciences

Laboratory Rearing , Biological Characteristics and Diapause Induction of the Onion Maggot , *Delia antiqua*

CHEN Bin , LI Wan-shun , FENG Guo-zhong , HE Zheng-bo , LI Ting-jing

(Institute of Entomology and Molecular Biology , Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances , Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : The onion maggot , *Delia antiqua* , is an ideal model species for the studies of the molecular mechanism of insect diapause , the stress resistance genes during diapauses , and the comparison of winter- and summer-diapause-specific genes. To meet the need of the research of the molecular mechanism of insect diapause and the stress resistance genes during diapauses , we introduced the onion maggot from Japan , designed rearing cage for the species , and established a stable laboratory population for the first time in China. We optimized the food recipe for larvae , the technique and condition of artificial rearing , and the diapause induction and termination of both winter and summer diapauses of the onion maggot based on earlier publications. We further observed the physiological and biological characteristics in each stages of normal development , winter and summer diapauses , and obtained all stages of samples of non-diapausing , winter-diapausing and summer-diapausing pupae for the study of molecular biology. More importantly , we worked out the optimal induce condition for summer-diapausing pupae to enhance the intensity of illumination , and acquired the pupae of 100% entering summer-diapause and winter-diapause. Here we report and review the laboratory rearing techniques , main biological characteristics , and the strategy of winter and summer diapause induction and termination.

Key words : *Delia antiqua* ; laboratory rearing ; artificial food ; biological characteristics ; diapause induction

(责任编辑 方 兴)