

印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的
形态学研究

李海怡, 任太军, 刘海远, 钟国华

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:将果蝇置于含印楝素 2 mg/kg 的昆虫培养基中产卵,待卵孵化发育至不同虫态,运用光学显微镜及扫描电镜研究果蝇新羽化成虫复眼外观,发现复眼明显萎缩并呈现不规则状,表面粗糙,出现异常凹陷,刚毛缺失或增生,排列不规则或弯曲;运用透射电镜研究复眼超微结构,结果表明,3 龄末期幼虫复眼组织细胞中染色质高度聚集成小体、小体分散,吞噬泡数量明显增多,核膜皱缩、界限模糊,蛹和新羽化成虫复眼中感光细胞丢失. 这些结果确证了印楝素诱导果蝇复眼发育异常,为寻找新型昆虫生长发育调节剂提供了可能的新靶标.

关键词:印楝素; 黑腹果蝇; 复眼; 发育异常; 形态

中图分类号: S482.39 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2012)03-0331-05

Abnormal Morphological Development of *Drosophila melanogaster*
Compound Eyes Induced by Azadirachtin

LI Hai-yi, REN Tai-jun, LIU Hai-yuan, ZHONG Guo-hua

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The morphological characters of compound eyes dysplasia in *Drosophila melanogaster* induced by azadirachtin was investigated. Flies were allowed to lay eggs on food mixture with 2 mg/kg of azadirachtin on which the resultant larvae and adults were fed and sampled for observation at different developmental stages. The images of stereo microscope and scanning electron microscope showed that adult eyes treated with 2 mg/kg of azadirachtin became smaller in size, irregular in ommatidia organization, rough on surface, duplicated, bent and forked in interommatidial bristles. The ultrastructure of compound eyes was characterized by transmission electron microscope. Results showed that chromatin condensation, phagocytic vacuole increase, nuclear membrane shrinkage, boundary fuzziness occurred in eye cells at the late third instar larvae, and they also showed that photoreceptors loss in different degrees at pupae and new adults. These results suggested that azadirachtin could induce abnormal morphological development in *D. melanogaster* compound eyes, which may gain a new insight into novel insect growth regulators.

Key words: azadirachtin; *Drosophila melanogaster*; compound eyes; dysplasia; morphology

复眼(Compound eyes)是昆虫的主要视觉器官,对于昆虫的取食、觅偶、群集、归巢、避敌等都起着重要的通讯和定向作用. 复眼的基本组成单元是小眼,每个小眼由水晶体、水晶锥体以及网膜或者感光细胞组成. 研究昆虫复眼,不仅可以为探讨昆虫视觉行为、进行仿生学研究应用提供基础,也可以为研究昆虫分类、昆虫习性等提供重要信息. 近年来,农药活性物质对复眼的影响引起了人们的关注,如印楝素

处理后,沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 出现明显的畸形复眼^[1],这为寻找杀虫剂新型作用靶标提供了又一可能.黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 复眼是含有800多个小眼的独立光感受器官,以规则的六边形排列,每个小眼含有20个细胞,其中8个特化为神经元(光感受器)R1~R8,4个是分泌晶状体物质的锥型细胞,其余是给予果蝇特征性红色素的色素细胞^[2].围绕果蝇复眼形态发生、发育的信号转导、细胞凋亡、调控基因等研究颇多^[3-5],但农药活性化合物对果蝇复眼的致畸作用研究报道极少.作者在研究植物源杀虫活性化合物调节昆虫生长发育机制时,发现印楝素处理能明显诱导果蝇复眼发育异常.本文报道了印楝素对果蝇复眼发育的致畸作用,旨在为今后寻找具有新型作用方式的天然源活性化合物,深入研究特异性作用机制提供参考.

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和化合物

黑腹果蝇,野生型 Oregon-R. 培养温度 25 ℃,相对湿度 65%~85%.培养基使用标准玉米培养基^[6].供试药剂为 95% 印楝素 A($C_{35}H_{44}O_{16}$, $M_r = 20.00$),购自 Sigma 公司.

1.2 印楝素处理黑腹果蝇

称取适量印楝素溶于丙酮配成 1 000 mg/L 终质量浓度的母液,然后分别加到标准玉米培养基中,配制成 0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg/kg 的加药培养基,对照组(CK)加入等量的双蒸水.按雌:雄=1:1 比例将 20 对新羽化黑腹果蝇分别放到上述加药培养基中,让其产卵,然后让卵在 1.1 标准饲养条件下发育.8 h 后移走果蝇,防止不同时期的卵混淆,并计算幼虫发育时间^[7-8].

1.3 光学显微镜观察黑腹果蝇复眼发育形态

在光学显微镜(美国 Leica 公司)下观察新羽化成虫复眼,拍照记录复眼形态学变化,考察各浓度处理对复眼发育形态的影响,同时根据诱导效果、试虫死亡率等为以下试验选定合适的供试药剂浓度.

1.4 扫描电镜观察黑腹果蝇复眼发育形态

从 1.3 试验中发现印楝素 5 mg/kg 处理时果蝇死亡率较高,而以 2 mg/kg 处理时致畸作用明显,且死亡率相对较低,有利于进一步研究对复眼发育的影响.取新羽化的对照组和处理组果蝇,切取头部,迅速加入到 φ 为 2.5% 戊二醛溶液中进行前固定,4 ℃ 过夜,0.1 mol/L 二甲基砷酸钠缓冲液(pH7.0)漂洗 3 次,每次 10 min,然后用 $w = 1\%$ 锇酸固定 1 h,

0.1 mol/L 二甲基砷酸钠缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min,分别以体积比为 50%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇依次脱水,每次 10 min.醋酸异戊酯过渡 2 次,每次 15 min,喷金后用 XL-30ESEM 环境扫描电子显微镜(荷兰 FEI 电子光学有限公司)观察并拍照.

1.5 印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的超微结构观察

取在 1.2 条件饲养发育的 3 龄末期幼虫、蛹(化蛹后 8 h 内)和新羽化成虫(羽化后 12 h 内),解剖处理组和对照组果蝇复眼,按照常规方法进行前处理,迅速转移到 φ 为 2% 的多聚甲醛-戊二醛混合固定液中固定^[9],然后用 0.1 mol/L 二甲基砷酸钠缓冲液(pH 7.0)漂洗 5 次,每次 15 min, $w = 1\%$ 锇酸固定 1 h 后,再用上述二甲基砷酸钠缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min,然后依次分别以体积比为 50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇脱水,每次 10 min.环氧丙烷脱水过夜.以环氧丙烷和 Epon812 环氧树脂体积比分别为 3:1、1:1 和 1:3 混合物依次进行渗透,每次 30 min.纯 Epon812 环氧树脂包埋,室温过夜,置 70 ℃ 烘箱中聚合 8 h 后进行修块、定位与切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,TECNAI G² 12 分析型透射电镜(荷兰 FEI 电子光学有限公司)观察细胞内部形态.

2 结果与分析

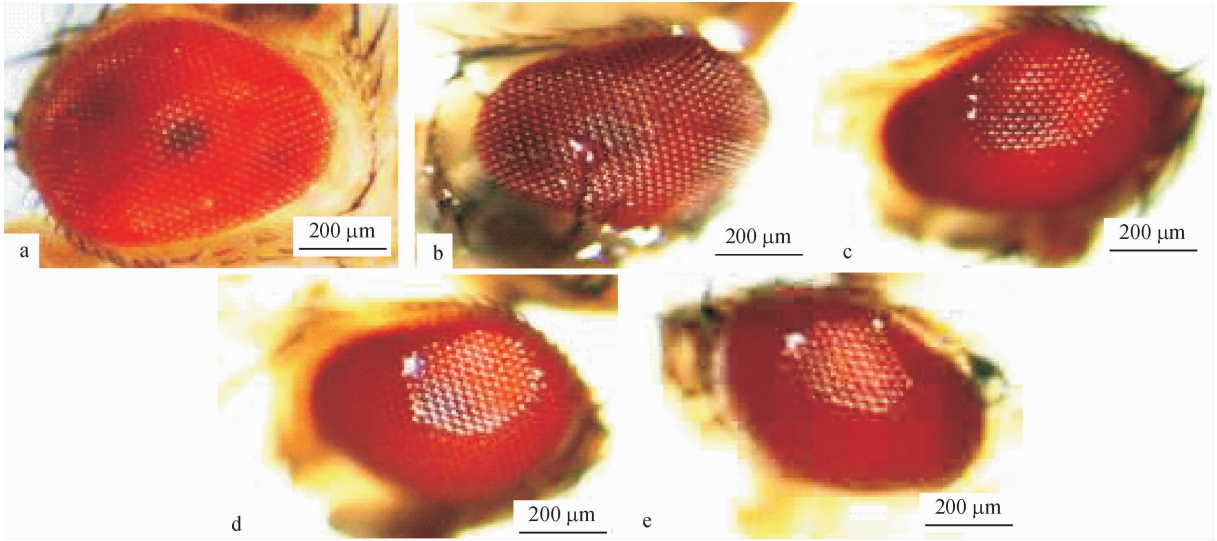
2.1 印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的光学显微形态观察

一般情况下,正常野生型黑腹果蝇成虫的复眼鲜红,位于头部两侧,其外部形态略呈圆形,向外微凸(图 1a).每只复眼约由 800 个小眼组成^[8],小眼在复眼上呈规则整齐分布.印楝素处理后,黑腹果蝇复眼整体外观形态变化不是很明显,但表面颜色明显变暗,个体小于 CK.随着印楝素处理剂量的提高,小眼数量显著减少,数量的减少与印楝素浓度密切相关,0.5、1.0 和 2.0 mg/kg 处理小眼数量依次减少(图 1b~1d),5.0 mg/kg(图 1e)与 2.0 mg/kg 处理的小眼数量差异不显著.

2.2 印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的扫描电镜分析

运用扫描电镜研究了印楝素对黑腹果蝇复眼表面结构的影响,结果见图 2. CK 组果蝇复眼呈规则的圆形或卵圆形,表面单眼和刚毛排列整齐规则(图 2a、2b),印楝素 2 mg/kg 处理后,果蝇复眼明显变小,并呈现不规则形状,与 CK 相比有不同程度的凹

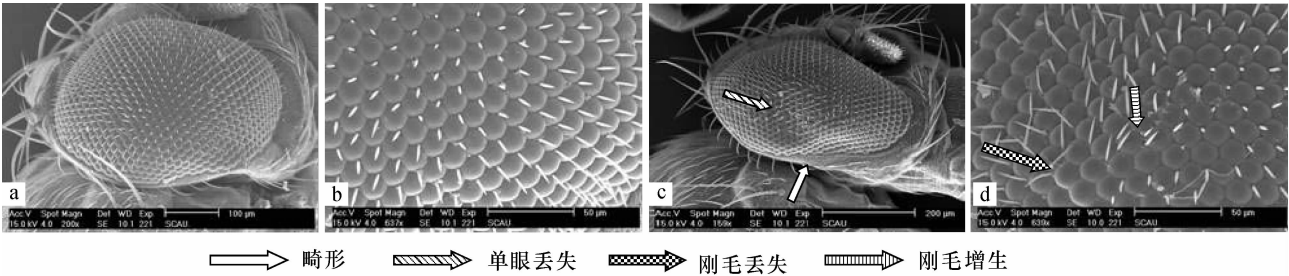
陷出现,表面粗糙,小眼不同程度地丢失,复眼表面刚毛排列不规则、弯曲,表现为有的小眼之间没有刚毛,有的小眼之间有多根刚毛(图2c、2d).这些异常现象都是印楝素诱导果蝇复眼发育异常的表现.



a: 对照成虫复眼;b: 0.5 mg/kg 印楝素处理成虫复眼; c: 1.0 mg/kg 印楝素处理成虫复眼;
d: 2.0 mg/kg 印楝素处理成虫复眼;e: 5.0 mg/kg 印楝素处理成虫复眼.

图1 光学显微镜观察印楝素处理对黑腹果蝇成虫复眼形态的影响

Fig.1 Effects of azadirachtin on the morphology of compound eyes in *Drosophila melanogaster* adult observed by stereo microscope



a、b:对照成虫复眼;c、d: 2 mg/kg 印楝素处理成虫复眼.

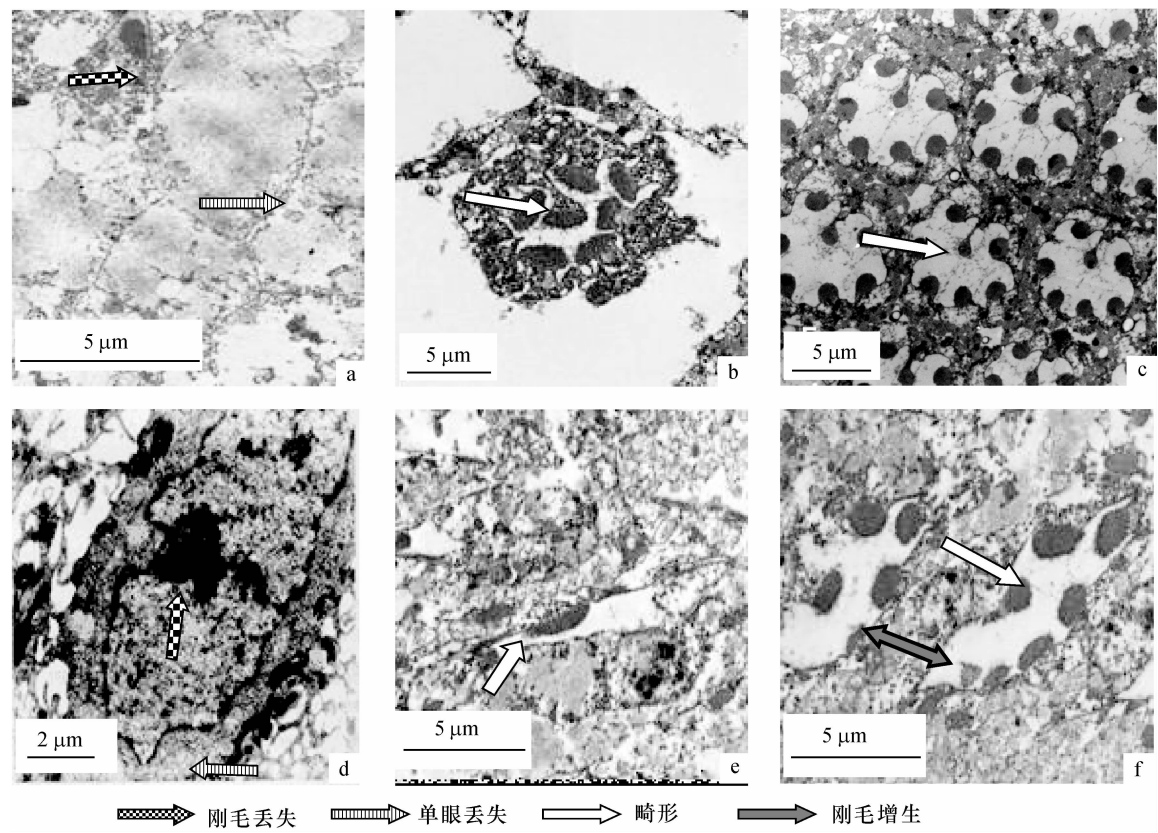
图2 扫描电子显微镜观察印楝素处理对黑腹果蝇成虫复眼表面结构的影响

Fig.2 Effects of azadirachtin on the surface structure of compound eyes in *Drosophila melanogaster* adult observed by scanning electron microscope

2.3 印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的透射电镜超微结构形态学特征

昆虫视觉系统中的小眼为长柱状结构,数目较多,外为集光部,内为感光部,感光部主要由色素细胞、网膜细胞和视杆组成.每个网膜细胞彼此分隔,色素细胞主要分布在角膜细胞和网膜细胞的周围,染色后为黑褐色,由外向内着色并逐渐减弱,视杆位于视觉柱中央,视觉柱中有7个感光细胞,其轴突穿过复眼底部的视神经孔与视叶相连^[7, 9-11].运用透射电镜超微研究印楝素诱导黑腹果蝇复眼细胞形态特征变化,结果见图3.果蝇幼虫发育到3龄后期,复眼开始发育时,CK组复眼细胞染色质均

匀分布在核中,核膜界限清晰(图3a),印楝素2 mg/kg处理后,细胞中染色质高度聚集成小体,染色质小体分散、不均匀,吞噬泡数量明显增多,核膜皱缩、界限模糊(图3b);发育至蛹时,CK组清晰可见7个感光细胞完整存在(图3c),印楝素2 mg/kg处理组同期复眼中感光细胞大部分丢失(图3d),甚至只剩R7感光细胞;在刚羽化的成虫中,CK试虫复眼结构清晰,排列整齐(图3e),而印楝素2 mg/kg处理的成虫出现明显的感光细胞缺失(图3f).这些内部结构的异常与扫描电镜所得的外部形态畸形结果一致,再次证实印楝素可诱导果蝇复眼发育畸形.



a,b:3 龄幼虫；c,d:蛹；e,f:新羽化成虫. 其中 a,c,e 为对照,b,d,f 为 2 mg/kg 印楝素处理.

图 3 印楝素诱导黑腹果蝇复眼发育异常的超微结构特征

Fig.3 Ultrastructure of compound eyes induced by azadirachtin in *Drosophila melanogaster* observed by transmission electron microscope

4 讨论与结论

作为代表性的植物源农药,印楝素对昆虫的作用方式主要是生长发育调节作用,不仅抑制昆虫整体的生长发育,而且会对昆虫的前胸腺、翅、生殖腺、脑等特定的组织器官发育产生显著的作用^[12-13]. 如印楝素以 20 mg/kg 剂量混匀在人工饲料中饲喂亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 3~4 龄幼虫 2 d,幼虫期延长、不能化蛹而死亡^[14];印楝素处理后,亚洲玉米螟 5 龄幼虫的 shsp、hsp90、蜕皮激素受体、酚氧化酶原、抑血细胞聚集素等基因表达上调. 研究人员证实,印楝素能够影响某些特定基因的表达模式及表达水平^[15]. 连续 4 d 用 6 和 15 mg/kg 印楝素处理的叶片饲喂小菜蛾 *Plutella xylostella* 3 龄幼虫,幼虫不能蜕皮而死亡的比例分别为 37.88% 和 42.60%,化蛹率分别为 62.12% 和 57.40%,羽化率分别为 25.58% 和 15.79%,均明显低于 CK^[16]. 研究表明,印楝素对印度谷蛾 *Plodia interpunctella* 有拒食和毒性作用,使印度谷蛾体内的蛋白质、糖原和脂质含量减少,从而抑制谷蛾发育^[17]. 另外,印楝素在体内能够间接降低黄粉虫消化酶的活性,导致储能物质减少,从而明显抑制黄粉虫 *Tenebrio molitor* 的生长发

育^[18]. 相关研究表明印楝素对昆虫生长、蜕皮和生殖的抑制作用可能都是继发性的,主要是由于印楝素会抑制细胞分裂或微管形成而引起的^[19]. 印楝素对昆虫复眼发育的影响也有少量文献提及,如印楝素处理长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* 后,可引起复眼发育异常甚至复眼缺失^[20]. 印楝素处理后,蜜蜂复眼形态与对照差异明显^[21]. Anuradha 等^[8]综合运用遗传学技术方法,证实了在印楝素处理后,羽化成虫约 60% 表现出中等至严重程度的复眼出现不规则的变形. 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 卵经印楝素处理后,胚胎中的脑和复眼的畸形率可达 90% 左右^[1]. 但这些报道均仅观察到对复眼的外观形态有不同程度的致畸作用,印楝素对小眼、感光细胞等复眼内部组成的影响鲜见报道. 本文研究表明,印楝素能显著影响黑腹果蝇复眼生长发育,处理试虫复眼明显变小并呈现不规则状,表面粗糙、有不同程度的凹陷,刚毛排列不规则、弯曲,刚毛缺失或增生,内部结构则是感光细胞不同程度地丢失. 这说明印楝素处理能诱导昆虫复眼发生显著的形态特征变化,其诱导的感光细胞缺失可能是导致复眼外形出现畸形的主要原因. 这些结果可为针对昆虫特异性组织器官寻找新型高效生长发育调节剂提供有益参考.

果蝇复眼发育与细胞凋亡息息相关,如在复眼发育过程中特定表达促凋亡基因 *rpr* 和 *hid*,引起视网膜启动细胞凋亡导致复眼消融,成虫期 *rpr* 和 *hid* 基因在成虫果蝇光感受器细胞中能够引起快速的细胞死亡,且抑制凋亡蛋白 P35 能很好地抑制这一过程^[22]。透射电镜观察显示,印楝素 2 mg/kg 处理后,复眼组织细胞中染色质高度聚集成小体,染色质小体分散、不均匀,吞噬泡数量明显增多,核膜皱缩、界限模糊。这是细胞凋亡的典型症状之一,也与我们已经验证的印楝素诱导昆虫细胞凋亡的部分特征^[23-25]相符。印楝素是否通过诱导细胞凋亡而致使果蝇复眼发育异常并致畸,仍有待进一步研究验证。

参考文献:

- [1] GHAZAWY N A, AWAD H H, ABDEL RAHMAN K M. Effects of azadirachtin on embryological development of the desert locust *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera: Acrididae) [J]. J Orthoptera Research, 2010, 19(2): 327-332.
- [2] CAGAN R. Principles of *Drosophila* eye differentiation [J]. Curr Top Dev Biol, 2009, 89: 115-135.
- [3] TSACHAKI M, SPRECHER S G. Genetic and developmental mechanisms underlying the formation of the *Drosophila* compound eye [J]. Developmental Dynamics, 2012, 241(1): 40-56.
- [4] AMORE G, CASARES F. Size matters: The contribution of cell proliferation to the progression of the specification *Drosophila* eye gene regulatory network [J]. Dev Biol, 2010, 344(2): 569-577.
- [5] BAKER N E, FIRTH L C. Retinal determination genes function along with cell-cell signals to regulate *Drosophila* eye development: Examples of multi-layered regulation by master regulators [J]. Bioessays, 2011, 33(7): 538-546.
- [6] 聂传朋. 果蝇的生活史及其人工饲养 [J]. 生物学通报, 2002, 37(2): 21.
- [7] SULLIVAN W, ASHBURNER M, HAWLEY R S. *Drosophila* protocols [M]. Beijing: Science Press, 2004: 617-620.
- [8] ANURADHA A, ANNADURAI R S, SHASHIDHARA L S. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A [J]. Insect Biochem Molec, 2007, 37(6): 627-634.
- [9] HSU C D, ADAMS S M, O'TOUSA J E. Rpr- and hid-driven cell death in *Drosophila* photoreceptors [J]. Vision Res, 2002, 42(4): 507-516.
- [10] 暴学祥, 李伟红, 李霞, 等. 黑腹果蝇视觉系统显微结构的研究 [J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2004, 36(1): 71-77.
- [11] GOYAL L, MCCALL K, AGAPITE J, et al. Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function [J]. The EMBO J, 2000, 19(4): 589-597.
- [12] SCHMUTTERER H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree [J]. J Ann Rev Entmol, 1990, 35: 271-298.
- [13] SCHMUTTERER H. The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine industry and other purposes [M]. New York: VCH Publishers, 1995: 495-517.
- [14] 赵善欢, 张兴, 刘秀琼, 等. 印楝素对亚洲玉米螟幼虫生长发育的影响 [J]. 昆虫学报, 1984, 37(3): 241-247.
- [15] OHN M L, JANG-EOK K, KYEONG-YEOLL L. Effects of azadirachtin on the development and gene expression of fifth instar larvae of Indianmeal moth, *Plodia interpunctella* [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2012, 15(1): 101-105.
- [16] 胡美英, 赵善欢, 王良川, 等. 印楝素制剂对小菜蛾毒杀和生长发育抑制作用的研究 [J]. 华南农业大学学报, 1996, 17(4): 1-5.
- [17] KACEM R, HAITAM A, NOUREDDIN B, et al. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. J Stored Prod Res, 2008, 44(3): 290-294.
- [18] 宋宜娟, 韩红岩, 许维岸. 印楝素对黄粉虫生长发育、能量储存及相关消化酶的影响 [J]. 农药, 2011, 50(6): 414-416.
- [19] MORGAN E D. Azadirachtin, a scientific gold mine [J]. Bioorgan Med Chem, 2009, 17(12): 4096-4105.
- [20] BITONDI M M G, MORA I M, SIMOES Z L P, et al. The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue [J]. J Insect Physiol, 1998, 44(5/6): 499-507.
- [21] ABROL D P, DEVINDER S. Morphogenic and toxic effects of pesticides on honeybee brood [J]. J Research, SKUAST-J, 2007, 6(2): 144-159.
- [22] HUANG Jing-fei, SHUI Ke-juan, LI Hai-yi, et al. Anti-proliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* S1-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53 [J]. Pestic Biochem Phys, 2011, 99(1): 16-24.
- [23] REMBOLD H, ANNADURAI R S. Azadirachtin inhibits proliferation of Sf 9 cells in monolayer culture [J]. J Bio-sciences, 1993, 48(5/6): 495-499.
- [24] 钟国华, 水克娟, 吕朝军, 等. 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(6): 618-627.
- [25] 钟国华, 水克娟, 黄劲飞, 等. 植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(4): 449-453.

【责任编辑 李晓卉】