

# 日本柄瘤蚜茧蜂的寄生对黑豆蚜 生化代谢的影响

甘 明<sup>1,2</sup> 苗雪霞<sup>1</sup> 丁德诚<sup>1</sup>

(1. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 上海 200032;

2. 中山大学中山医学院寄生虫教研室, 广州 510080)

**摘要:** 日本柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus japonicus* Ashmead 的寄生影响了寄主黑豆蚜 *Aphis craccivora* Koch 体内的生化代谢。寄生使黑豆蚜的游离氨基酸总浓度升高, 寄生1天后, 正常组的游离氨基酸总浓度为17.721nmol/L, 被寄生组为23.153nmol/L; 寄生4天后, 正常组和被寄生组分别为58.703和69.659nmol/L。苏氨酸、谷氨酸和酪氨酸是黑豆蚜血淋巴中主要的氨基酸, 被寄生后的黑豆蚜血淋巴中苏氨酸含量升高, 谷氨酸和酪氨酸含量下降。与正常蚜虫相比, 被寄生后3天, 黑豆蚜血淋巴的蛋白质浓度下降, 体蛋白质浓度升高; 寄生还使寄主血淋巴的蛋白质组成发生了变化, 在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中出现了两个新的蛋白质, 其分子量分别约为54和41kD。在被寄生后4天, 黑豆蚜的血淋巴海藻糖浓度明显降低。蚜虫的体总糖原和体总脂含量在被寄生后2天显著升高, 但在被寄生后3、4天明显低于未寄生蚜虫。

**关键词:** 黑豆蚜; 日本柄瘤蚜茧蜂; 寄生; 代谢

寄生蜂要在寄主体内成功完成发育, 必须克服寄主的免疫防御, 获得寄主的营养物质, 并改变寄主的内分泌系统。这需要寄生蜂对寄主的生理状况和生化代谢进行调控, 使寄主的体内环境朝向对蜂幼虫有利的方向改变。寄生对寄主生化代谢的影响在鳞翅目中研究较多。试验结果表明, 被寄生后寄主的血淋巴蛋白质图谱经常出现质和量的变化。在蚜虫-蚜茧蜂系统中, 相关的研究比较少。近年来, 有些学者在此领域开展了一些研究。Pennacchio等<sup>[1,2]</sup>研究了阿维蚜茧蜂 *Aphidius ervi* Haliday 的寄生对豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (Harris) 的生化代谢的影响; Digilio等<sup>[3]</sup>则探究了蚜茧蜂的卵巢液和毒液对蚜虫血淋巴蛋白质的调节作用。但是, 目前有关蚜茧蜂对蚜虫的生化调节、营养调控和调节因子的研究还远远不够, 仍然欠缺基本的信息。

基金项目: 中国科学院院长基金资助

作者简介: 甘明(1975-), 女, 现为广州市中山大学中山医学院寄生虫教研室博士后, 研究方向为昆虫生理生化(E-mail: ganming75@sina.com)

收稿日期: 2002-06-24

黑豆蚜 *Aphis craccivora* Koch 是危害严重的世界性害虫,日本柄瘤蚜茧蜂 *Lysiphlebus japonicus* Ashmead 是其重要的寄生性天敌,对黑豆蚜有较好的控制作用。作者以日本柄瘤蚜茧蜂-黑豆蚜为系统,研究了蚜茧蜂对蚜虫的蛋白质、游离氨基酸、糖类和脂类代谢的影响,为更好地认识蚜虫-蚜茧蜂的相互关系提供基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样品的准备

黑豆蚜与天敌日本柄瘤蚜茧蜂均采自上海郊区,黑豆蚜用蚕豆苗饲养,并已在实验室内繁殖多代。昆虫在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、L:D = 16:8 光周期条件下饲养。

蚜虫血淋巴用玻璃毛细管快速收集,5 只蚜虫约可收集  $1\mu\text{l}$  血淋巴。 $5\mu\text{l}$  血淋巴用 1ml 90% 乙醇沉淀,离心,沉淀用于测血淋巴蛋白质浓度。相应的虫体(被寄生的蚜虫移去寄生蜂幼虫)干燥至恒重,匀浆用于体蛋白质浓度分析,匀浆物溶于 1mol/L NaOH 溶液。寄生组选用 2 龄若蚜接蜂寄生 12h。由于被寄生后 5 天有部分蚜虫开始化僵蚜,无法收集血淋巴,因此,均取被寄生后 4 天内的蚜虫血淋巴进行测定。

### 1.2 蛋白质与游离氨基酸的检测

蛋白质浓度测定按照 Bradford 法。用 UV755B 紫外可见分光光度计在 595nm 处测 OD 值。以牛血清白蛋白作标准曲线。每个浓度值重复 5 次。将吸取的血淋巴立即稀释,存于  $-20^\circ\text{C}$ ,采用不连续垂直板电泳系统进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,在 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液中进行,浓缩胶恒压 100V,分离胶恒压 125V。用考马斯亮蓝 R-250 染色。蛋白质分子量标准为 14.4~97.4kD。

取被寄生后 1 天和 4 天蚜虫及各自对照进行氨基酸浓度测定。被寄生后 4 天蚜虫先解剖移去蜂幼虫(被寄生后 1 天蚜虫体内蜂尚未孵化,很难找到,故未解剖移去),然后在冰冷的 80% 甲醇中匀浆,以 13000g 离心 10min 后,取上清液于日立 835-50 型氨基酸自动分析仪上进行游离氨基酸的测定。

### 1.3 糖类物质的测定

采用硫酸蒽酮法,用 UV755B 紫外可见分光光度计在 600nm 处测 OD 值。以葡萄糖作标准曲线。每个浓度值重复 5 次。血淋巴中海藻糖的测定:在一定量的血淋巴中加入 90% 乙醇溶液,离心,除去蛋白质沉淀。将上清液稀释到一定浓度后,取稀释液 0.2ml 加 0.4ml 0.15 mol/L 硫酸,沸水浴中 10min,冷却,加 0.4ml 30% 氢氧化钾(KOH),煮沸 10min,硫酸蒽酮法测定。蚜体总糖原的测定:将蚜虫称重后(被寄生的蚜虫先移去寄生蜂幼虫),在 0.4ml 30% KOH 中匀浆,100℃ 水浴中 15min,以消化体内组织。冷却后加入 0.1ml 饱和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,用 1ml 95% 乙醇沉淀糖原,低速离心后弃去上清液,将沉淀溶于 0.5ml 水中,硫酸蒽酮法测定。

### 1.4 蚜体总脂的测定

脂类含量用重量测定法确定。将待测蚜虫在  $38^\circ\text{C}$  干燥至恒重,在玻璃匀浆器中以氯仿:甲醇(2:1, V/V)匀浆,昆虫组织的重量和有机溶剂体积的比例约为 1:15~20。匀浆后的组织转移至带塞玻璃量筒中,加 0.2 倍体积的 0.15mol/L NaCl 溶液洗涤,盖塞充分摇

匀,静置。溶液分为上下两相,下相是纯脂类,上相用吸管吸出,重复 2 次。将含脂类的下相在 70℃条件下蒸干至恒重。每个浓度值重复 5 次。

1.5 数据分析

在各项试验中,被寄生组与正常组数据的统计分析均采用 SPSS 10.0 软件进行 *t*-检验。“\*”表示  $P \leq 0.05$ ,“\*\*”表示  $P \leq 0.01$ 。

2 研究结果

2.1 寄生对寄主蛋白质、糖类和脂类浓度的影响

被寄生组与正常组的血淋巴蛋白质浓度在被寄生后 1、2 天均升高,差异不明显。被寄生后 3 天被寄生组血淋巴蛋白质浓度下降至  $11.35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,此时正常组维持在  $17.93 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,两者之间出现显著差异。被寄生后 4 天被寄生组与正常组的血淋巴蛋白质浓度都下降,未有明显差异。被寄生组的体蛋白质浓度表现出逐渐降低的趋势,正常组蚜虫的体蛋白质浓度先降后升。在被寄生后 3 天,正常组的体蛋白质浓度明显低于被寄生组(表 1)。

与未寄生蚜虫相比,寄生使寄主后期的血淋巴海藻糖浓度明显下降。黑豆蚜被寄生后 1、2、3 天的血淋巴海藻糖浓度与正常对照组没有明显差异。被寄生后 4 天,两组的血淋巴海藻糖浓度均表现上升,但寄生组的血糖浓度明显低于相应正常组。被寄生后 2 天,每头黑豆蚜的体总糖原含量明显高于正常组,被寄生后 3、4 天,每头蚜虫的体总糖原含量显著降低,均低于相应正常组(表 1)。

正常组和被寄生组蚜虫在被寄生后 1 天,每头蚜虫的体总脂含量相当。被寄生后 2 天,被寄生组的脂类含量明显高于正常组。但在被寄生后 3 天,正常组每头蚜虫的体总脂含量明显升高,并超出被寄生组,二者存在极显著差异。被寄生后 4 天,被寄生组仍明显低于正常组(表 1)。

表 1 寄生对寄主蛋白质、糖类和脂类浓度的影响

Table 1 Effect of parasitism on concentration of host proteins, carbohydrates and lipids

| 被寄生后天数<br>Days post<br>oviposition |   | 蛋白质浓度<br>Concentration of protein                                |                                                          | 糖类浓度<br>Concentration of carbohydrate                              |                                                                       | 脂类浓度<br>Concentration of lipid                                    |
|------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                    |   | 血淋巴蛋白质<br>( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )<br>Haemolymph<br>protein | 体蛋白质<br>( $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重)<br>Body<br>protein | 血淋巴海藻糖<br>( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )<br>Haemolymph<br>trehalose | 体总糖原<br>( $\mu\text{g}/\text{individual}$ )<br>Total body<br>glycogen | 体总脂<br>( $\mu\text{g}/\text{individual}$ )<br>Total body<br>lipid |
|                                    |   |                                                                  |                                                          |                                                                    |                                                                       |                                                                   |
| 正常组                                | 1 | $8.55 \pm 1.1$                                                   | $236.77 \pm 32.6$                                        | $3.31 \pm 1.0$                                                     | $3.91 \pm 1.0$                                                        | $14.00 \pm 1.2$                                                   |
| Nonparasitized                     | 2 | $16.81 \pm 1.3$                                                  | $189.49 \pm 12.5$                                        | $3.42 \pm 1.3$                                                     | $6.94 \pm 2.2$                                                        | $14.50 \pm 2.5$                                                   |
|                                    | 3 | $17.93 \pm 1.6$                                                  | $153.36 \pm 13.5$                                        | $3.22 \pm 0.6$                                                     | $8.26 \pm 2.5$                                                        | $27.00 \pm 1.0$                                                   |
|                                    | 4 | $12.24 \pm 0.8$                                                  | $221.90 \pm 89.1$                                        | $8.22 \pm 0.6$                                                     | $7.64 \pm 1.1$                                                        | $27.33 \pm 3.3$                                                   |
| 寄生组                                | 1 | $10.81 \pm 1.9$                                                  | $240.95 \pm 19.6$                                        | $3.67 \pm 1.2$                                                     | $4.22 \pm 0.8$                                                        | $12.50 \pm 1.7$                                                   |
|                                    | 2 | $16.39 \pm 2.0$                                                  | $222.23 \pm 19.7$                                        | $3.26 \pm 0.8$                                                     | $10.66 \pm 2.1^{**}$                                                  | $28.70 \pm 2.6^{*}$                                               |
|                                    | 3 | $11.35 \pm 1.7^{*}$                                              | $210.24 \pm 14.0^{*}$                                    | $2.77 \pm 0.7$                                                     | $6.98 \pm 1.7^{**}$                                                   | $35.50 \pm 1.9^{**}$                                              |
|                                    | 4 | $14.04 \pm 1.2$                                                  | $200.55 \pm 59.3$                                        | $5.11 \pm 1.0^{*}$                                                 | $6.06 \pm 8.9^{**}$                                                   | $17.33 \pm 1.3^{*}$                                               |

## 2.2 蛋白质电泳

电泳检测了 2 龄若蚜被寄生后 1、2、3、4 天和相应的正常对照蚜虫的血淋巴蛋白质组成。结果显示,寄生影响了黑豆蚜血淋巴蛋白质的组成,导致了分子量约为 54 和 41kD 的两个新蛋白质的出现(图 1,箭头所示)。在被寄生后 3 天,蛋白质图谱的变化较为明显。从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上看,分子量为 54kD 的蛋白质浓度相对较高,从被寄生后 3 天就开始大量表达,分子量为 41kD 的蛋白质在被寄生后 3 天仍无显著增加,直到被寄生后 4 天才明显可见。

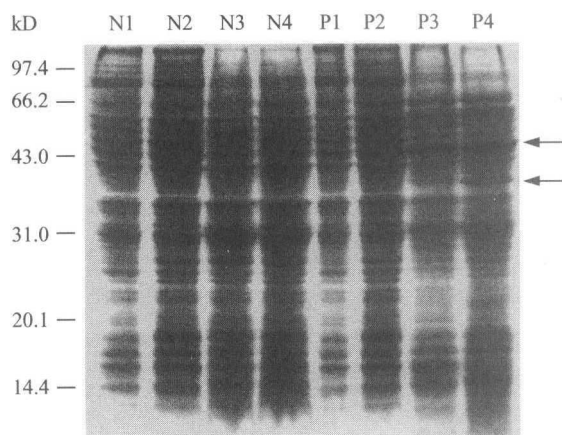


图 1 正常蚜虫与被寄生蚜虫血淋巴蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析图谱

Fig.1 SDS-PAGE analysis of haemolymphatic proteins of *A. craccivora* parasitized by *L. japonicus* and corresponding nonparasitized control

注: P1、P2、P3、P4 分别是被寄生后 1、2、3、4 天的样品, N1、N2、N3、N4 是相应的正常组。箭头表示两个寄生特异蛋白。  
Note: Haemolymph samples were collected on 1(P1), 2(P2), 3(P3) and 4(P4) days after parasitoid oviposition. N1, N2, N3, N4 were the corresponding nonparasitized control. Parasitism-specific proteins were denoted with arrows.

## 2.3 寄生对游离氨基酸的影响

黑豆蚜血淋巴中有 17 种氨基酸被测定,其中包括 10 种必需氨基酸和 7 种非必需氨基酸(表 2)。苏氨酸、谷氨酸和酪氨酸三种氨基酸的含量最高,共约占 50%~70%,其余氨基酸的相对百分含量在 0.6%~6.5%之间。寄生没有使血淋巴中游离氨基酸种类发生变化,但总氨基酸浓度在被寄生后升高。

## 3 讨论

被寄生蚜虫的糖类和脂类含量在被寄生后期都明显低于正常蚜虫,并且黑豆蚜的血淋巴蛋白质浓度在被寄生后 3 天显著下降,此时的体蛋白质浓度却明显高于正常组。Pennacchio 等<sup>[1]</sup>认为被寄生后蚜虫体内的营养物质的含量变化是与蚜茧蜂的发育密切相关的。这与笔者的观察结果相类似。根据解剖观察,日本柄瘤蚜茧蜂大约在寄生 48h 后孵化,第 3 天开始大量取食蚜虫的血淋巴和体内组织,这可能造成了寄主体内营养物质的

表 2 寄生对寄主血淋巴游离氨基酸的影响

Table 2 Effect of parasitism on concentration of host haemolymph free amino acids

| 氨基酸组成<br>Amino acid | 氨基酸含量(相对%) Relative percentage of single amino acid |                |                   |                |
|---------------------|-----------------------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|
|                     | 正常组 1 天                                             | 被寄生组 1 天       | 正常组 4 天           | 被寄生组 4 天       |
|                     | Nonparasitized 1d                                   | Parasitized 1d | Nonparasitized 4d | Parasitized 4d |
| 天冬氨酸 Asp            | 4.1                                                 | 3.6            | 6.5               | 3.0            |
| 苏氨酸 Thr             | 24.6                                                | 22.2           | 14.1              | 20.9           |
| 丝氨酸 Ser             | 5.3                                                 | 6.0            | 2.0               | 9.2            |
| 谷氨酸 Glu             | 13.9                                                | 14.3           | 27.1              | 11.1           |
| 脯氨酸 Pro             | 6.5                                                 | 6.6            | 5.1               | 6.4            |
| 甘氨酸 Gly             | 2.1                                                 | 4.5            | 1.4               | 2.4            |
| 丙氨酸 Ala             | 6.2                                                 | 5.4            | 5.7               | 3.2            |
| 半胱氨酸 1/2Cys         | —                                                   | 0.9            | 0.6               | —              |
| 缬氨酸 Val             | 6.0                                                 | 5.7            | 5.5               | 7.7            |
| 甲硫氨酸 Met            | 1.8                                                 | 1.6            | 0.9               | 0.7            |
| 异亮氨酸 Ile            | 2.0                                                 | 1.7            | 2.0               | 1.3            |
| 亮氨酸 Leu             | 1.3                                                 | 0.8            | 2.1               | 1.1            |
| 酪氨酸 Tyr             | 14.1                                                | 11.0           | 26.0              | 14.9           |
| 苯丙氨酸 Phe            | 0.6                                                 | 2.8            | 3.9               | 4.2            |
| 赖氨酸 Lys             | 6.4                                                 | 5.8            | 5.4               | 3.0            |
| 组氨酸 His             | 2.8                                                 | 2.6            | 3.8               | 2.7            |
| 总含量(nmol/L)         | 17.7                                                | 23.2           | 58.7              | 69.7           |
| Total concentration |                                                     |                |                   |                |

匮乏,使寄主血淋巴蛋白质含量出现明显下降,同时糖和脂含量也明显降低。脂肪体是昆虫进行生物合成的主要场所,血淋巴蛋白质含量的下降刺激了寄主的脂肪体大量合成蛋白质进行补充,从而导致血淋巴蛋白质浓度降低,而体蛋白质浓度升高的情况。

在被寄生后 2 天,日本柄瘤蚜茧蜂尚未孵化,黑豆蚜的体总糖原和体总脂含量却显著升高,这可能与随同蜂卵进入寄主体内的多分 DNA 病毒、畸形细胞、毒液等寄生影响因子有关。研究结果显示,寄生影响因子可通过调节激素分泌,使生化代谢途径发生改变<sup>[4]</sup>。日本柄瘤蚜茧蜂的寄生使黑豆蚜体总糖原和体总脂含量升高,但这之间有哪些因子起了作用以及作用的机理均有待进一步研究。

参 考 文 献

1 Pennacchio F, Digilio M C, Tremblay E. Biochemical and metabolic alterations in *Acyrtosiphon pisum* parasitized by *Aphidius ervi*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1995, 30: 351 - 367

2 Pennacchio F, Fanti P, Falabella P, et al. Development and nutrition of the braconid wasp, *Aphidius ervi* in aposymbiotic host aphids. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1999, 40: 53 - 63

3 Digilio M C, Pennacchio F, Tremblay E. Host regulation effects of ovary fluid and venom by *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). J. Insect Physiol., 1998, 44: 779 - 784

- 4 Pennacchio F, Vinson S B, Tremblay E, *et al.* Biochemical and developmental alterations of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by the endophagous parasitoid *Cardiochiles nigriceps* (V.) (Hymenoptera, Braconidae). Arch. Insect Biochem. Physiol., 1994, 26: 211 – 233

## Biochemical and metabolic alterations in *Aphis craccivora* Koch parasitized by *Lysiphlebus japonicus* Ashmead

Gan Ming<sup>1,2</sup> Miao Xuexia<sup>1</sup> Ding Decheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 2. Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** Biochemical and metabolic alterations in *Aphis craccivora* Koch parasitized by *Lysiphlebus japonicus* Ashmead are reported. Experiments were carried out on parasitized 2nd instar aphids. Parasitism increased the total free amino acid level in hemolymph, with the Thr, Glu and Tyr as the most dominating relative abundance. On days 1 and 4 after parasitoid oviposition, the free amino acid levels were 23.153nmol/L, 69.659nmol/L respectively. In contrast, that of normal hosts were 17.721nmol/L and 58.703nmol/L. The increase of Thr and decrease of Glu and Tyr were observed. The hemolymph protein level descended, while the body protein level ascended on 3 days after parasitoid oviposition. PAGE analysis of hemolymph revealed the presence of two parasitism-specific proteins, which of approximately 54 and 41kD. A significant decline in hemolymph trehalose concentration was determined on 4 days after the aphid being parasitized. The total body glycogen and total body lipid titers were significant higher on 2 days after the aphid being parasitized, then distinct lower than the normal aphids on 3 and 4 days after parasitoid oviposition.

**Key words:** *Aphis craccivora* Koch; *Lysiphlebus japonicus* Ashmead; parasitism; metabolism