

文章编号:1001-7380(2018)06-0022-04

松墨天牛被管氏肿腿蜂寄生后体内蛋白质含量的变化

徐丽丽,解春霞,郑华英,刘云鹏

(江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153)

摘要:管氏肿腿蜂(*Sclerodermus guani*)是多种林木钻蛀性害虫的体外寄生蜂,雌蜂通过蜇刺注射毒液和卵巢蛋白对寄主体内的营养物质进行调节。为明确肿腿蜂寄生后松墨天牛体内各部位蛋白质含量的变化,使用考马斯亮蓝法对初始组、第2天(寄主初麻痹时)、第14天(幼蜂初孵时)的处理组和对照组的松墨天牛虫体、表皮、血淋巴和脂肪体的蛋白质含量进行测定。结果表明:处理组松墨天牛虫体和脂肪体内的蛋白质含量在第2天均显著高于初始组,虫体蛋白质含量在第14天显著低于第2天,与同期对照组相反。处理组松墨天牛的虫体、脂肪体和血淋巴中蛋白质含量在第2天皆显著高于初始组,而表皮则相反;虫体与脂肪体蛋白质含量显著低于第2天,而表皮与血淋巴则相反;虫体的变化与脂肪体的变化趋势相同。该研究结果为进一步了解雌蜂对寄主的调控机理提供了一定的理论基础。

关键词:管氏肿腿蜂;寄主调控;外寄生蜂;松墨天牛;蛋白质代谢

中图分类号:O629.73;S763.38;S763.43

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.06.006

Changes in protein contents of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae parasitized by *Sclerodermus guani* (Hymenoptera: Chrysidoidea)

Xu Lili, Xie Chunxia, Zheng Huaying, Liu Yunpeng

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China)

Abstract: *Sclerodermus guani* is the ectophytic parasitoid of many wood-boring insects. The females inject venom and ovarian proteins by sting to adjust the nutrient metabolism of the hosts. The total protein contents in the larva, cuticle, hemolymph and fat body of the host insects of control group and parasitized group on day 2 and 14, and initial group were examined with Bradford's method, to investigate the changes of the protein contents in different sections of the host larvae before and after parasitism. The results were as follows: The protein contents in the larva and fat body of parasitized alternative host larvae on the second day, were significantly higher than those of the initial group. And lower level of the protein contents in the larva were observed on the 14th day than on the second day. These were contrary to the variations of the control group without parasitism at the same period. The protein contents in the larva, fat body and hemolymph of parasitized alternative host larvae on the second day, were significantly higher than those of the initial group, which was contrary in cuticle. The protein contents in the larva and fat body on the 14th day were significantly lower than on the second day, which was contrary in hemolymph. The variations of the protein contents were similar between the larva and fat body. Our results will provide a basis for further studies on the adjusting and controlling mechanism of the parasitoid to the host.

Key words: *Sclerodermus guani*; Host regulation; Ectophytic parasitoid; *Monochamus alternatus*; Protein metabolism

收稿日期:2018-10-26;修回日期:2018-11-25

基金项目:中央高校基本业务费专项资金

作者简介:徐丽丽(1991-),女,浙江台州人,硕士。主要研究方向:森林保护学。E-mail:jiangfeimeng@126.com。

管氏肿腿蜂 (*Sclerodermus guani*), 属膜翅目 (Hymenoptera) 青蜂总科 (Chrysidoidea) 硬皮肿腿蜂属, 是多种林木钻蛀性害虫的体外寄生蜂^[1]。该天敌昆虫的寄主类别多, 分布区域广泛, 且寄生效果好, 已大规模应用于林业钻蛀性害虫的生物防治, 可以有效地防治松墨天牛 (*Monochamus alternatus*)、光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*)、双条杉天牛 (*Semanotus bifasciatus*) 和青杨天牛 (*Saperda populnea* L.) 等^[2-4]。

寄主昆虫被寄生蜂寄生后, 其体内血淋巴和脂肪体中各物质的浓度发生变化, 以利于寄生蜂幼蜂的生长发育^[5-6]。管氏肿腿蜂对寄主的寄生属抑性寄生, 其蜇刺会导致寄主麻痹和中枢神经系统失调, 注射的相应物质能够有效抑制寄主的氧化反应, 对于雌蜂产卵后寄主的防腐以及为下一代幼虫的生长发育提供相应的营养物质至关重要^[7-8]。蛋白质是生物体生长发育所必须的营养物质。椰心叶甲幼虫被寄生后, 表皮蛋白质含量显著降低^[9]; 小蜂 (*Euplectrus* sp. near *plathypenae*) 寄生东方粘虫 (*Pseudaletia separata*) 后寄主脂肪体中蛋白质含量先升后降, 血淋巴中蛋白质持续上升^[10]。棉大卷螟甲腹茧蜂 (*Chelonus inanitus*) 寄生夜蛾 (*Spodoptera littoralis*), 蝶蛹金小蜂 (*Pteromalus puparum*) 寄生菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 后, 寄主血淋巴中的蛋白质含量变化趋势不同^[11-12]。本文从管氏肿腿蜂寄生后寄主体内各部位——虫体、脂肪体 (营养物质储存和代谢加工器官)、血淋巴 (幼蜂的主要营养来源)、表皮 (寄主保护作用) 蛋白质含量的变化进行研究, 探索雌蜂对寄主体内的营养转向的调节, 旨在为该天敌昆虫的林间应用提供新的室内试验证据和理论依据, 为寄生蜂的繁育过程提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本次试验所用松墨天牛, 于2017年12月采集自溧阳天目湖镇的马尾松上, 当天将采集到的松墨天牛带回实验室保存于4℃冷冻备用, 第2天进行试验处理。管氏肿腿蜂雌蜂种蜂购自南京康林宝生物科技有限公司。

1.2 试验设计

依据柳建定等对松墨天牛幼虫龄期的划分方法, 选取同日采集的大小相近的5龄松墨天牛幼虫200头, 头壳宽为 (3.881 ± 0.177) mm^[13]。随机选

取40头作为初始组, 直接测取10头幼虫虫体、30头幼虫表皮、脂肪体和血淋巴的蛋白质含量 (各部位蛋白质含量测定所需幼虫头数下同), 为第0天数据。剩余160头随机分成2组 (各80头), 置于口径1 cm的玻璃管内, 其中1组接种管氏肿腿蜂, 每头松墨天牛人为接种管氏肿腿蜂雌蜂5头, 为处理组; 另1组不进行接种, 为对照组。进行处理后, 使用棉花堵塞管口, 防止松墨天牛和肿腿蜂逃逸。然后, 置于江苏省天敌生物繁育场内, 室内温度保持恒温28℃。在以下各个时间点分别对2组松墨天牛进行蛋白质含量测定: ①处理组松墨天牛初被麻痹时 (第2天)。②处理组肿腿蜂所产卵开始孵化时 (第14天)。其中, 处理组进行蛋白质含量测定前, 去除肿腿蜂雌蜂和其所产的卵。所有处理中每个部位蛋白质的测定为10个重复, 其中表皮、脂肪体和血淋巴由于量较少, 测定时选取每3头幼虫进行混合作为1个重复。

1.3 血淋巴的获取

将松墨天牛幼虫在-20℃冷冻麻痹3 min, 取出后用75%的酒精清洗体表, 后用pH 7.4的PBS清洗干净, 在滤纸上擦干体表, 称取质量。解剖时, 用干净的解剖剪在幼虫胸腹处剪出微小口子, 用毛细管吸取血淋巴后, 转移到冰浴条件下的已加入少许苯硫脲晶体的0.5 mL离心管中^[14]。

1.4 脂肪体的获取

选取松墨天牛幼虫, 在75%酒精中消毒后, 置于解剖镜下, 使用镊子按住头部, 用消毒过的尖嘴镊夹住幼虫的尾节, 轻轻拉出完整的中肠、马氏管, 再去除头部, 后沿腹中线纵向剪开幼虫虫体, 用镊子和药勺将脂肪体刮到5 mL离心管中^[15]。

1.5 表皮的获取

将已进行脂肪体收集的样品, 取下体壁, 在解剖镜下, 小心刮去肌肉组织及皮细胞层, 用蒸馏水冲洗干净, 在滤纸上擦干后收集置2 mL离心管中^[16]。

1.6 蛋白质的测定方法

考马斯亮蓝法。使用不同浓度的标准蛋白-考马斯亮蓝 G-250 溶液, 制作蛋白质标准曲线^[17]。称取松墨天牛样品 (虫体、脂肪体、表皮) 质量后 (W), 放入研钵中, 加入5 mL蒸馏水在冰浴中研磨匀浆, 离心 ($4\ 000\ \text{r/min}$, $10\ \text{min}$), 取上清液用于蛋白质含量的测定。取0.1 mL上清液 (血淋巴直接取0.1 mL), 加入蒸馏水0.9 mL, 再加入5 mL考马斯亮

蓝 G-250 试剂,充分混合,室温静置 2 min 后,以加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂和 1 mL 蒸馏水的试管作参比,在 595 nm 波长下比色,记录吸光度。根据所测样品提取液的吸光度,在标准曲线上查得相应的蛋白质含量 $C(\mu\text{g/mL})$ 。

最终所得蛋白质含量 $X(\text{mg/g}) = C \times 5 / (1\,000 \times W)$ 。

C —根据标准曲线查样品提取液中的蛋白质含量 $(\mu\text{g/mL})$;

W —样品质量 (g) ;

5—样品提取液体积 (mL) 。

1.7 数据分析

数据的统计与计算分析使用了 Microsoft Office Excel(微软公司,美国);数据的方差分析与相关折线图使用 Graphpad Prism 5(Graphpad 公司,美国)软件,差异性分析使用单因素方差分析,Tukey's 多重比较。

2 结果与分析

2.1 虫体

松墨天牛虫体内的蛋白质含量变化如图 1 所示。处理组天牛虫体蛋白质含量,在麻痹初期(第 2 天)极显著高于初始组和同期对照组;在幼蜂初孵时(第 14 天)极显著低于麻痹初期和同期对照组。而对照组,第 14 天的虫体蛋白质含量显著高于第 2 天和初始组,且第 2 天与初始组无显著差异。

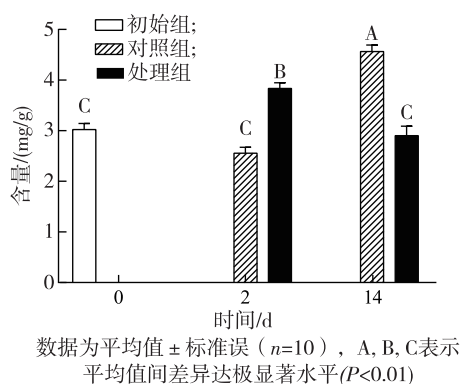


图 1 松墨天牛虫体内的蛋白质含量变化

2.2 表皮

松墨天牛表皮中的蛋白质含量变化如图 2 所示。处理组蛋白质含量,在麻痹初期极显著低于初始组和同期对照组;在幼蜂初孵时,与麻痹初期和同期对照组无显著差别。而对照组,第 2 天的蛋白

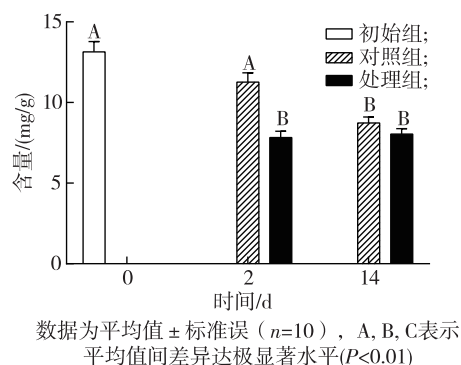


图 2 松墨天牛表皮中蛋白质含量变化

质含量与初始组无显著差别,第 14 天极显著低于初始组和第 2 天。

2.3 血淋巴

松墨天牛血淋巴的蛋白质含量变化如图 3 所示。由图可知,处理组天牛血淋巴蛋白质含量,在麻痹初期显著高于初始组,但与同期对照组无显著差异;在幼蜂初孵时,显著高于麻痹初期和同期对照组。对照组血淋巴蛋白质含量在各时间点未见显著差异。

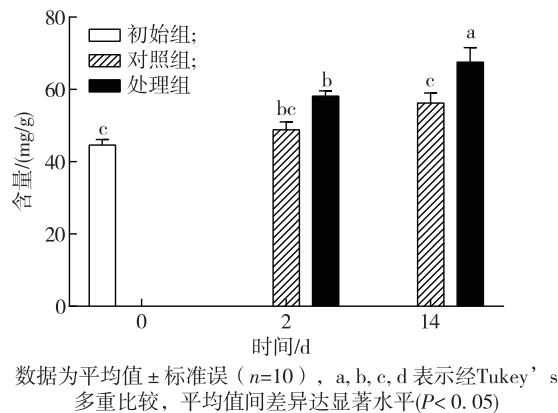


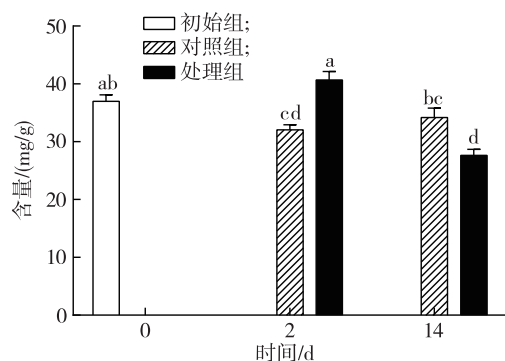
图 3 松墨天牛血淋巴中蛋白质含量变化

2.4 脂肪体

松墨天牛脂肪体内蛋白质含量变化如图 4 所示。处理组天牛脂肪体内的蛋白质含量,在麻痹初期显著高于同期对照组,但与初始组无显著差异;在幼蜂初孵时,显著低于麻痹初期和同期对照组。对照组,第 2 天蛋白质含量显著低于初始组,与第 14 天的 2 组之间未见显著差异。

3 结论与讨论

处理组松墨天牛虫体和脂肪体内的蛋白质含



数据为平均值 ± 标准误 ($n=10$), a, b, c, d 表示经Tukey's 多重比较, 平均值间差异达显著水平 ($P<0.05$)

图4 松墨天牛脂肪体内蛋白质含量变化

量在第2天均显著高于初始组,虫体蛋白质含量在第14天显著低于第2天,与同期对照组相反。寄主松墨天牛各部位之间的蛋白质含量变化有所不同,表皮的变化与其他部位不同,虫体的变化与脂肪体相似。

在试验过程中,寄主松墨天牛无法进行取食,其体内各部位的蛋白质含量变化,除却自身消耗外,与寄生蜂的蜇刺与取食密切相关。在幼蜂初孵时,处理组脂肪体蛋白质含量显著低于同期对照组,而血淋巴中蛋白含量则相反,与黄芳的研究相一致^[18]。可能是由于脂肪体是重要的代谢加工器官,天牛营养物质的消耗与转化最先开始于脂肪体,其内的蛋白质向血淋巴转移^[19]。处理组虫体蛋白质含量,在麻痹初期显著高于初始组和同期对照组,与Cônsoi等(2005)的研究结果相类似^[20];而在幼蜂初孵时低于同期对照组和麻痹初期,可见在第2—14日中,寄主体内可能存在蛋白质向其他更易被寄生蜂幼虫吸收的营养物质转化。本次研究中发现处理组松墨天牛在麻痹初期蛋白质含量高于初始组,与吴华的研究发现松墨天牛被管氏肿腿蜂寄生后虫体蛋白质含量持续下降有所不同^[5],可能与选取的时间点不同有关。肿腿蜂的蜇刺对寄主松墨天牛的蛋白质含量进行了调节与控制,使其向有利于子代幼虫取食、吸收、发育的方向变化,与Vinson等提出的“寄生调节”理念相符^[21]。

较之初始组,处理组松墨天牛,虫体、脂肪体和血淋巴中蛋白质含量在麻痹初期显著增加,而表皮则相反;在幼蜂初孵时,虫体与脂肪体蛋白质含量显著低于麻痹初期,而表皮与血淋巴则相反;虫体的变化与脂肪体的变化相似。血淋巴中的蛋白质含量在麻痹初期和幼蜂初孵时皆高于同期对照组,

且随时间变化含量升高。各部位蛋白质含量在幼蜂初孵前与同期对照组相比,表皮未见差异,虫体和脂肪体处理组皆显著低于对照组。Alleyne等的研究认为寄生蜂可以通过调节脂肪体的代谢来调控血淋巴中的生化变化^[22],可见雌蜂蜇刺松墨天牛后不仅存在蛋白质向其他物质转化的可能,还存在虫体其他部位的蛋白质向血淋巴转移的可能。

参考文献:

- [1] 杨忠岐,王小艺,曹亮明,等. 管氏肿腿蜂的再描述及中国硬皮肿腿蜂属 *Sclerodermus* (Hymenoptera: Bethyridae) 的种类[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 1-12.
- [2] 刘云鹏,施建华,王金中. 花绒寄甲与管氏肿腿蜂防治光肩星天牛效果初探[J]. 江苏林业科技, 2014, 41(5): 6-9,36.
- [3] 王小军,郭桂凤. 应用管氏肿腿蜂防治双条杉天牛技术研究[J]. 中国森林病虫, 2007, 26(4): 28-29.
- [4] 张海岐. 管氏肿腿蜂在悬铃木光肩天牛中防治上的应用[J]. 中国园艺文摘, 2018(5): 109,193.
- [5] 吴华. 管氏肿腿蜂个体发育、产卵行为及寄主选择性研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [6] THOMPSON S N. Parasitism enhances the induction of glucogenesis by the insect, *Manduca sexta* L [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2001, 33(2): 163-173.
- [7] 贺凯,徐志强,代平礼. 管氏肿腿蜂对黄粉甲的寄生行为[J]. 昆虫学报, 2006, 49(3): 454-460.
- [8] 朱家颖,杨璞,吴国星,等. 管氏肿腿蜂毒液器官超微结构观察[J]. 四川动物, 2011, 30(3): 404-408.
- [9] 孙蕊芬,龚声辉,姜迎娅,等. 椰心叶甲幼虫被寄生后体壁主要物质含量的变化[J]. 湖南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(3): 306-307.
- [10] NAKAMATSU Y, TANAKA T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource [J]. Journal of Insect Physiology, 2003, 49(2): 149-159.
- [11] SALVADOR G, CONSOLI F L. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) [J]. Biological Control, 2008, 45(1): 103-110.
- [12] 吕慧平,蔡峻,叶恭银,等. 寄生对越冬代菜粉蝶蛹血淋巴中蛋白质和糖类代谢的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(6): 611-615.
- [13] 柳建定,李百万,王菊英,等. 松褐天牛龄级划分方法初探[J]. 浙江林业科技, 2008, 28(4): 80-86.
- [14] 王岩,马纪,刘小宁. 昆虫血淋巴的收集技术与方法[J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 147-151.

(下转第29页)

子,导致黑斑病的发生;而圆形果实不利于黑斑病分生孢子的附着,黑斑病病症相对较轻。我国薄壳山核桃推广建园尚处于初始阶段,黑斑病还没有大规模的爆发^[11],所以在推广中应选择抗病性较强的圆形果实品系,如无性系1、波尼等,提前进行预防,而大果品系马汉、无性系3等,易感黑斑病,发病率较高,建议推广中谨慎大规模推广,以免后期造成损失。

对于已有病害发生的种植园,需及时清理严重的病果、病枝和病叶集中焚烧,同时通过喷洒波尔多液或甲基托布津可湿性粉剂等化学防治的办法,除治病害和减轻危害。另外,要根据不同种植园的情况,适时翻耕松土,施肥除草,干旱及时浇水,合理调整种植密度,营造透光通风环境等营林措施,增强树体自身免疫力,达到抵抗病害的目的。

参考文献:

- [1] 何海洋,彭方仁,李小飞,等.薄壳山核桃果园虫害调查分析[J].江苏林业科技,2015,42(2):10-14.
- [2] 姚小华,常 君,王开良.中国薄壳山核桃[M].北京科学出版社,2014.

- [3] 董凤祥,王贵禧.美国薄壳山核桃引种及栽培技术[M].北京:金盾出版社,2003.
- [4] 戚钱钱,陈秀龙,时浩杰,等.薄壳山核桃病虫害调查及主要病虫害防治关键技术[J].中国森林病虫,2016,35(2):30-33.
- [5] 张传清,徐志宏,孙品雷,等.新病害——山核桃果实黑斑病病原菌的鉴定[J].植物保护,2010,36(4):160-162.
- [6] SHI H J, ZHANG C Q, SHAN L Y, et al. First report of *Pestalotiopsis microspora* as a causal agent of black spot of pecan (*Carya illinoensis*) in China[J]. Plant Disease, 2015, 9(9):1276.
- [7] 杨 莉,李丕军,朱 莲,等.核桃不同品种对褐斑病抗性调查及化学防治药剂的筛选[J].中国森林病虫,2018,27(4):39-42.
- [8] 习学良,范志远,邹伟烈,等.10个美国山核桃品种的引种研究初报[J].浙江农林大学学报,2006,23(4):382-387.
- [9] 巨云为,赵盼盼,黄 麟,等.薄壳山核桃主要病害发生规律及防控[J].南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(4):31-36.
- [10] 彭方仁,李永荣,郝明灼,等.我国薄壳山核桃生产现状与产业化发展策略[J].林业工程学报,2012,26(4):1-4.
- [11] 覃文榜,覃文更.环江县美国山核桃主要病虫害调查及其防治技术[J].黑龙江农业科学,2016(4):165-166.

(上接第25页)

- [15] NAKAMATSU Y, TANAKA T. The function of a trypsin-like enzyme in the saliva of *Euplectrus separatae* larvae [J]. Journal of Insect Physiology, 2004, 50(9): 847-854.
- [16] 王文全,龚国玑,谭福杰.灭幼脲毒理学研究—Ⅷ.灭幼脲对粘虫幼虫表皮蛋白质系列的影响[J].南京农业大学学报,1995,18(4):33-38.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, (72):248-254.
- [18] 黄 芳.半闭弯尾姬蜂调控寄主小菜蛾的生理机制研究[D].杭州:浙江大学,2009.
- [19] EBERHARD W G, CORDERO C. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sex-

- ual selection and reproductive physiology [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1995, 10(12): 493-496.
- [20] CÔNSOLI F L, BRANDT S L, COUDRON T A, et al. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigricipes*-*Heliothis virescens* [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 142(2): 181-191.
- [21] VINSON S B, IWANTSCH G F. 1980. Host regulation by insect parasitoids [J]. Quarterly Review of Biology, 1980, 55(2): 143-165.
- [22] ALLEYNE M, BECKAGE N E. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata* [J]. Journal of Insect Physiology, 1997, 43(4): 407-424.