

浅黄恩蚜小蜂寄生对烟粉虱海藻糖含量、酶活和热激蛋白表达水平的影响

王颖颖^{1,2}, 王甦^{2*}, 张帆², 李飞^{1*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要: 本文以烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius 及其优势寄生蜂浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia* (Girault & Dodd) 为研究对象, 测定了浅黄恩蚜小蜂寄生烟粉虱若虫后 6、12、24、48 和 72 h, 寄主体内海藻糖含量、海藻糖酶活性变化以及 3 种热激蛋白基因的即时表达情况。结果表明, 自寄生蜂寄生后烟粉虱体内海藻糖含量先升高后降低, 而海藻糖酶活性则先降低后升高, 二者的变化拐点均表现在寄生后 24 h。此外, 寄生能够诱导烟粉虱 *hsp90* 过量表达, 但同时抑制 *hsp70* 的表达。热激蛋白 *hsp20* 的表达量先升高后降低, 且 3 种基因均在寄生后 12 h 开始出现表达差异。本研究证明海藻糖和热激蛋白参与了寄生蜂与寄主互作体系, 同时探讨了二者在寄生蜂与寄主互作过程中的具体作用, 对于揭示寄生蜂-寄主互作机制有一定的参考价值。

关键词: 浅黄恩蚜小蜂; 烟粉虱; 热激蛋白; 海藻糖; 海藻糖酶

中图分类号: S476.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2015)03-0297-08

The Effect of Parasitization by *Encarsia sophia* on the Content of Trehalose, the Activity of Trehalase and Expression of Heat Shock Protein Genes of *Bemisia tabaci* Nymph

WANG Yingying^{1,2}, WANG Su^{2*}, ZHANG Fan², LI Fei^{1*}

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Changes of trehalose and trehalase activity and expression levels of three heat shock protein genes in *Bemisia tabaci* were measured at 6, 12, 24, 48 and 72 h after parasitization by *Encarsia sophia*. Contents of trehalose peaked at 24 h and then decreased, while trehalase activity was low until 24 h after parasitization and then increased. Parasitization induced high expression of *hsp90* gene but suppressed expression of *hsp70* gene. Expression level of *hsp20* gene increased in the early stage after parasitization and was then reduced. The three genes were differentially expressed starting at 12 h after parasitization. This study indicates the involvement of trehalose and heat shock protein in parasitoid-host immunity interaction.

Key words: *Encarsia sophia*; *Bemisia tabaci*; heat shock protein; trehalose; trehalase

在长期的协同进化过程中, 寄主昆虫与寄生蜂之间分别演化出一套防御与反防御机制^[1]。寄主昆虫利用自身的防御系统杀死部分蜂卵^[2]。寄生蜂则依靠毒液 (venom)、多分 DNA 病毒 (polydnavirus, PDV)、卵巢蛋白 (ovarian protein, OP)、类病毒颗粒 (virus like particle, VLP)、类病毒纤丝 (virus like filament, VLF)、及其分泌蛋白 (teratocyte secretory proteins, TSP) 等寄生因子抑制寄主的自身防御反应^[3]。此外, 寄生蜂还会破坏寄主的保护酶系统并对寄主的生长发育和新陈代谢等进行调控^[4,5]。

热激蛋白 (heat shock protein, Hsp) 是一类重要的保护性多肽, 其在生物体内高度保守, 当生物体受

收稿日期: 2015-03-10

基金项目: 国家“973”计划 (2013CB127600); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJCX20140101); 北京市科技计划项目 (D141100000914000)

作者简介: 王颖颖 (1989-), 女, E-mail: 978834492@qq.com; *通信作者, 王甦, 副研究员, E-mail: wangsu@baafs.net.cn; 李飞, 教授, E-mail: lifei@njau.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2015.03.001

到高温、高寒、缺水、重金属、病原物等逆境刺激后会大量表达,以减轻逆境胁迫引起的伤害^[6]。在应激情况下,热激蛋白可与其他重要的蛋白质结合,防止蛋白质变性失活^[7]。研究表明,热激蛋白可诱导细胞因子产物、黏着分子表达,还可将信号或肽传递给抗体,是免疫反应的调控子^[8]。此外,热激蛋白家族在调控昆虫生长发育、分化等方面也起着重要作用^[9,10]。

海藻糖(trehalose)广泛存在于低等动物、藻类、细菌、真菌、酵母、昆虫和其他无脊椎动物中,既是重要的储能物质,又是应激胁迫的重要次生代谢产物^[11-13]。昆虫在摄食、寻偶、迁飞、越冬等生命活动中所需的能量基本由海藻糖提供^[12]。而当昆虫处于高温、高寒、缺水等恶劣环境下,海藻糖又可像热激蛋白一样,在细胞表面形成特殊的保护膜,有效保护分子结构不受破坏^[14]。因此,海藻糖被认为是昆虫的血糖,其有无意味着生命体的生存或者死亡。

不同于高温等逆境胁迫,寄生这种带有生命活动的行为对于昆虫的外源影响更加复杂,而昆虫也会采取多种手段抵御寄生物的寄生。自20世纪70年代,人们逐渐开始关注寄生物入侵对海藻糖水平的影响^[15-17]。近些年,对寄生诱导的生物体热激蛋白基因转录水平的研究也逐渐增加^[18,19]。本文以重要农业害虫烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius 为研究对象,研究了其优势寄生蜂浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia* (Girault & Dodd) 寄生烟粉虱后,寄主体内海藻糖含量、海藻糖酶活的变化以及3种热激蛋白基因的转录水平。除了探究二者在寄生蜂寄生寄主过程中所起的作用外,还探究了二者之间在保护功能上的联系性,为进一步明确寄主的自我保护机制和寄生蜂调控寄主代谢机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究中所用的烟粉虱和浅黄恩蚜小蜂均为北京市农林科学院植物保护环境保护研究所温室内定殖种群。利用 mtDNA COI 基因序列^[20]鉴定烟粉虱为 Q 隐种。寄主植物为棉花(中棉所 49),待其长出 4 片真叶后放入自制养虫笼(铝合金+80 目纱网制,45.0 cm×50.0 cm×50.0 cm)内,每笼 4 株棉花,同时接入 300 对烟粉虱成虫进行扩繁。当烟粉虱若虫发育到 3 龄时,向笼内加入 50 头雌性浅黄恩蚜小蜂和 8 头雄性浅黄恩蚜小蜂,每隔 1 周,向养虫笼内补充新的带有足量烟粉虱若虫的棉花苗。本试验中,烟粉虱若虫既作为寄主供寄生蜂寄生又作为食物代替蜂蜜水供寄主取食。试验种群在温度(25±1)℃,相对湿度 60%~70%,光周期 16L:8D,光照强度 800 Lx 条件下扩繁。烟粉虱和浅黄恩蚜小蜂均饲养 5 代以上供试。

1.2 浅黄恩蚜小蜂寄生烟粉虱处理

选取一批长势良好的棉花(共 30 片叶子),每枚叶片接入 10 对烟粉虱,用微虫笼夹好,24 h 后移除。待烟粉虱若虫发育至 3 龄末或 4 龄初时(26℃下约 15 d)备用。将部分带有烟粉虱若虫的棉花叶片连同叶柄一齐剪下,放入事先铺好滤纸的培养皿内。叶柄处用脱脂棉包好,并浸湿。用解剖针将叶片上多余的烟粉虱若虫挑出,保证每枚叶片仅有 50 头。剩余叶片上的烟粉虱若虫不接入浅黄恩蚜小蜂,保留在植株上继续培养,作为对照。向每个培养皿内投入 60 头成功交配(令雌、雄蜂交配 24 h,以 5% 蜂蜜水为营养源^[21])的雌性浅黄恩蚜小蜂,寄主头数低于寄生蜂头数以保证每个寄主都有机会被寄生,期望寄生率能够接近 100%,1 h 后将蜂移走。分别于 6、12、24、48、72 h 后,于显微镜下用解剖针将被成功寄生的烟粉虱若虫挑出,解剖针慢慢贴近若虫两侧,向下挑起,使虫体与叶片分离,以避免伤及若虫,每个时间点处理各取 140 头。将每个时间处理的其中 40 头烟粉虱若虫于-20℃下冷冻 1 min,然后放于载玻片上,用解剖针逐个将寄生蜂卵剔除,收集烟粉虱剩余组织,置于 1.5 mL 离心管内并保存在超低温冰箱(DW-86L626,青岛海尔特种电器有限公司)中备用,用于海藻糖含量及其海藻糖降解酶活性的测定。剩余 100 头收集于 1.5 mL 离心管内,保存在-80℃下备用,用于实时荧光定量 PCR(ECO™,美国 ILLumina 公司)测定 3 种烟粉虱热激蛋白的相对表达。在相同时间点内,收集剩余叶片上未被寄生的烟粉虱若虫作为对照。头数与处理组一致,也按照每个处理 40+100 头进行取样,每个时间点设 3 个重复。

1.3 烟粉虱海藻糖含量的测定

海藻糖含量的测定参照 Ge 等^[22]的方法并稍加改进。将所有装有 40 头烟粉虱若虫的离心管内各加

100 μL 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS), 并充分研磨。再各加入 200 μL PBS 缓冲液, 进行细胞破碎 (超声波细胞粉碎机 UP-250, 宁波新芝生物科技股份有限公司) 20 s。4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 1000 r/min 离心 10 min (冷冻离心机 5424 R, 德国 Eppendorf 公司)。取 150 μL 上清液, 备用。剩下 150 μL 母液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 10 min。取 60 μL 上清液, 97 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min, 用以测定海藻糖。另取 50 μL 上清液, 用以测定蛋白 (蛋白染色法, 考马斯亮蓝为染色剂, 牛血清蛋白做标准曲线)。自 60 μL 上清液中取 30 μL , 再加入 30 μL 1% 的硫酸水溶液, 97 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后, 冰浴 5 min。再加入 30 μL 30% KOH 水溶液, 97 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 冰浴 5 min。再加入 4 倍体积的蒽酮-硫酸溶液 (2 mg 蒽酮/1 mL 80% 硫酸), 97 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 冰浴 5 min。用酶标仪 (Versa Max, 美国 MoLecuLar Devices 公司) 检测 620 nm 下的 OD 值。以一系列不同浓度 (0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 的海藻糖标准液制作标准曲线, 620 nm 下测定 OD 值。

1.4 烟粉虱海藻糖酶活性的测定

海藻糖酶活性的测定参照 Tatum 等^[23]的方法并稍加改进。将上一步中取出的 150 μL 上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 20000 r/min 离心 20 min。取上清液 30 μL , 用来测海藻糖酶; 另取上清液 50 μL , 用来测蛋白 (方法同上)。向 30 μL 上清液中加入 118.5 μL PBS, 1.5 μL 海藻糖标准液。混合后 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, 再 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min, 以终止反应。冰浴 5 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12000 r/min 离心 5~10 min。取 50 μL 上清液, 加入 100 μL Glucose oxidase/peroxidase reagent (美国 Sigma 公司), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min。再加入 100 μL 12 mol/L 硫酸水溶液, 540 nm 下测定 OD 值。以一系列不同浓度 (0、0.02、0.04、0.06、0.08 mg/mL) 的葡萄糖标准品制作标准曲线, 540 nm 下测定 OD 值。蛋白质的检测方法如 1.3。

1.5 寄生后不同时间点烟粉虱 *hsp20*、*hsp70* 和 *hsp90* 基因的表达

基于自 NCBI 中搜索所得烟粉虱 *hsp20* (热激蛋白 20, heat shock protein 20) (Accession: HM013708.1), *hsp70* (热激蛋白 70, heat shock protein 70) (Accession: HM013709.1) 和 *hsp90* (热激蛋白 90, heat shock protein 90) (Accession: HM013710.1) 基因序列, 利用 PrimerQuest 设计定量引物, 并根据烟粉虱 β -actin 基因设计内参引物。*hsp90*-F: 5'-CTTGGGAACAATCGCCAAATC-3'; *hsp90*-R: 5'-CGACAAGGAAAGCTGAGTAGAA-3'; *hsp70*-F: 5'-TGGTCCTCACCAAGATGAAAG-3'; *hsp70*-R: 5'-CCTCTGTGAGTCGTTGAAGTAG-3'; *hsp20*-F: 5'-CAACCTTGATGTTTCAGCAGTTC-3'; *hsp20*-R: 5'-GTCTTGCCTCTCCTCATGTTTA-3'; β -actin-F: 5'-TCAGGGTGTAATGGTCGGTA-3'; β -actin-R: 5'-TGATGATACCGTGCTCGATGG-3'。取被寄生后不同时间点的烟粉虱若虫为检测对象, 以相同发育时期未被寄生的烟粉虱若虫为对照, 采用 qRT-PCR 测定 3 种热激蛋白基因的相对表达量。采用 Trizol (Invitrogen 公司) 法对所有样品进行总 RNA 提取, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度并用微量分光光度计 (DS-11 Spectrophotometer, 美国 DeNovix 公司) 测定 RNA 的浓度。取 1 μg 总 RNA 作为模板, 利用反转录试剂盒 (PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 日本 TaKaRa 公司) 合成第一链 cDNA。从 cDNA 中取 2 μL 用作 PCR 的模板。再加入 SYBR Premix Ex Taq II (日本 TaKaRa 公司) 10 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , ddH₂O 6.8 μL , 上下游引物各 0.4 μL , 构成 20 μL 的反应体系。在 ECOTM 上进行荧光定量 PCR, 具体程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 40 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.6 数据统计与分析

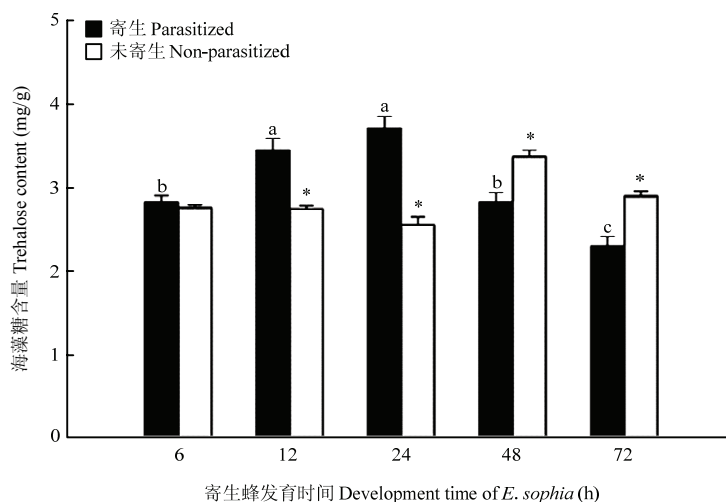
利用 SPSS 17.0 for Windows 对各试验所得数据进行统计分析, 获得平均值及标准误。对不同时间处理间的差异进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较 ($P < 0.05$)。对同一时间寄生组与对照组内海藻糖的差异和海藻糖酶的差异进行 independent-samples *t*-test ($P < 0.05$)。设内参基因表达量为基数 1, 采用 one-sample *t*-test 对同一时间寄生组内 3 种热激蛋白基因表达量的均值与内参基因基数的差异进行显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 寄生对烟粉虱体内海藻糖含量的影响

烟粉虱被浅黄恩蚜小蜂寄生后, 除寄生后 6 h, 其余时间点内海藻糖含量与对照相比均出现显著性差异 ($t_6 = 1.141$, $P > 0.05$; $t_{12} = 6.968$, $P < 0.05$; $t_{24} = 10.085$, $P < 0.05$; $t_{48} = -5.560$, $P < 0.05$; $t_{72} = -5.866$,

$P < 0.05$; 所有 $df = 4$)。在寄生后的不同时间点内,海藻糖含量出现先升高后降低的趋势。从寄生后 6~24 h,海藻糖含量不断升高,并在 24 h 达到最高值,处理组海藻糖含量显著高于对照。寄生后 24 h 海藻糖含量开始逐渐降低,在 72 h 达到最低值,期间处理组海藻糖含量均显著低于对照。寄生后 72 h,烟粉虱海藻糖含量与其他时间点之间均存在显著性差异 ($F = 43.018$, $P < 0.05$, $df = 4, 10$)。该结果说明浅黄恩蚜小蜂寄生影响了烟粉虱体内海藻糖的水平。寄生后 24 h 内,海藻糖主要发挥保护功能;24 h 后,寄生蜂的调控能力逐渐增强,导致海藻糖含量不断降低,释放能量供寄生蜂利用(图 1)。



注:数值为平均值±标准误。柱上“*”表示处理组与对照组之间海藻糖含量差异达到显著性水平($P < 0.05$)。柱上不同字母表示在处理组中不同时间点处理之间的海藻糖含量差异达到显著性水平($P < 0.05$)。下同。

Note: Data were mean ± SE. The “*” above bars indicated the significant difference of the content of trehalose between the treatment group and the control group ($P < 0.05$). Different letters above bars indicated significant difference of the content of trehalose among different treatment times in treatment groups ($P < 0.05$). The same for the following figures.

图 1 被浅黄恩蚜小蜂寄生后烟粉虱体内海藻糖含量变化

Fig. 1 Changes of trehalose content in the *B. tabaci* nymph parasitized by *E. sophia*

2.2 寄生对烟粉虱体内海藻糖酶活性的影响

烟粉虱被浅黄恩蚜小蜂寄生后 12、48 和 72 h,体内海藻糖酶的活性与对照相比均有显著性差异,而在寄生后 6 h 和 24 h 则无显著性差异 ($t_6 = 1.124$, $P > 0.05$; $t_{12} = -3.855$, $P < 0.05$; $t_{24} = 1.356$, $P > 0.05$; $t_{48} = 3.431$, $P < 0.05$; $t_{72} = 3.670$, $P < 0.05$; 所有 $df = 4$)。从整体水平看,海藻糖酶的活性呈现出先降低后升高的趋势。在寄生后 24 h 达到最低值,此后又逐渐增强,在 72 h 达到最高值,且与其他 4 个时间点之间均存在显著性差异 ($F = 7.037$, $P < 0.05$, $df = 4, 10$)。被寄生后 6、24、48 和 72 h,海藻糖酶的活性显著高于对照,而被寄生后 12 h 则显著低于对照。该结果与海藻糖的含量相对比,不难看出,在寄生后 6、24 h,海藻糖含量与海藻糖酶活均高于对照,而其他 3 个时间点则出现相反的结果。但本试验结果的总体趋势能够与海藻糖含量变化相吻合。这一结果说明浅黄恩蚜小蜂寄生影响了烟粉虱海藻糖酶的活性(图 2)。

2.3 寄生对烟粉虱 3 种热激蛋白基因表达的影响

从图 3 可以看出,浅黄恩蚜小蜂寄生诱导烟粉虱 *hsp90* 发生过量表达,且在寄生后 24、48、72 h,与对照相比,均有显著性差异 ($t_6 = 1.677$, $P < 0.05$; $t_{12} = 8.669$, $P < 0.05$; $t_{24} = 12.916$, $P < 0.05$; $t_{48} = 30.518$, $P < 0.05$; $t_{72} = 16.350$, $P < 0.05$; 所有 $df = 2$)。随着寄生时间的延长,*hsp90* 的相对表达量越来越高,在 72 h 达到 4.04 倍。寄生后 48 和 72 h, *hsp90* 的表达量与其他时间点相比均有显著性差异,而在寄生后 24 h 内则无显著性差异 ($F = 163.395$, $P > 0.05$, $df = 4, 10$)。与 *hsp90* 不同的是,被浅黄恩蚜小蜂寄生后,烟粉虱 *hsp70* 的表达量普遍低于对照,且在寄生后 24、48、72 h 均有显著性差异 ($t_6 = 1.330$, $P < 0.05$; $t_{12} = -4.387$, $P < 0.05$; $t_{24} = -6.220$, $P < 0.05$; $t_{48} = -12.001$, $P < 0.05$; $t_{72} = -9.441$, $P < 0.05$; 所有 $df = 2$)。

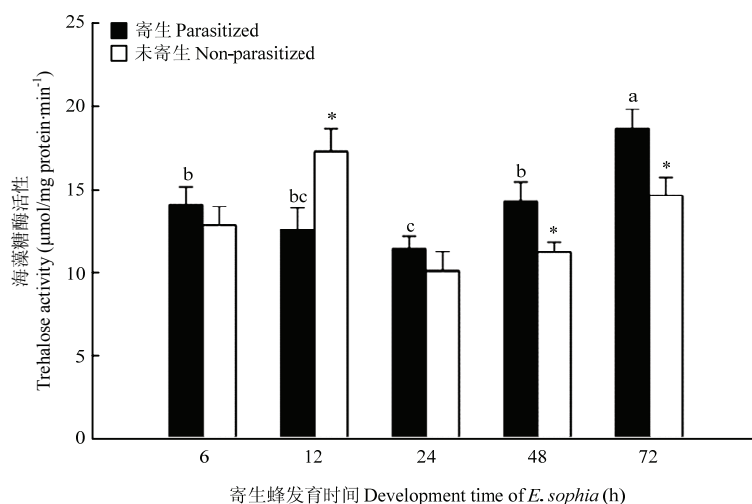
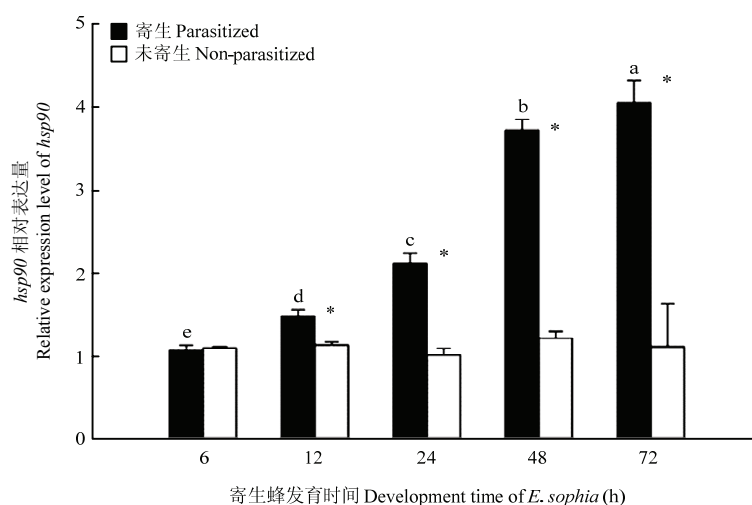


图2 被浅黄恩蚜小蜂寄生后烟粉虱体内海藻糖酶活性变化

Fig. 2 Changes of trehalase activity in the *B. tabaci* nymph parasitized by *E. sophia*

这一结果说明寄生蜂寄生抑制了烟粉虱 *hsp70* 的表达。从整体水平看, *hsp70* 的表达水平呈现不断下降趋势。其中寄生后 24 h 和 48 h 是两个转折点, 与前两个时间点相比均有显著性差异; 在寄生后 72 h, *hsp70* 的表达量显著低于对照, 但趋于稳定 ($F=28.905$, $P<0.05$, $df=4, 10$) (图 4)。图 5 表明, 寄生蜂寄生诱导烟粉虱 *hsp20* 先过表达, 后低表达。寄生后 6~24 h 内, *hsp20* 的表达量不断升高, 在 24 h 达到最大值, 且与其他时间点之间都存在显著性差异; 24 h 后表达量开始逐渐降低, 在 72 h 出现最低值, 该值与前面 4 个时间点均存在显著性差异 ($F=44.706$, $P<0.05$, $df=4, 10$)。与对照相比, *hsp20* 的表达量在寄生后 24、48、72 h 均有显著性差异 ($t_6=-0.066$, $P<0.05$; $t_{12}=19.467$, $P<0.05$; $t_{24}=5.989$, $P<0.05$; $t_{48}=-6.848$, $P<0.05$; $t_{72}=-16.706$, $P<0.05$; 所有 $df=2$), 说明寄生蜂寄生也影响了 *hsp20* 的正常表达。以上试验结果表明, 浅黄恩蚜小蜂的寄生显著影响了烟粉虱 *hsp90*、*hsp70* 和 *hsp20* 的表达, 热激蛋白可能作为一种保护性物质参与烟粉虱的应激反应, 而寄生蜂在某些时期也对寄主的防御反应进行了抑制, 因此导致热激蛋白表达量出现差异。而不同热激蛋白基因出现不同的表达水平可能与其各自的结构、功能以及作用时间等有关。

图3 被浅黄恩蚜小蜂寄生后烟粉虱体内 *hsp90* 的表达水平Fig. 3 mRNA expression levels of *hsp90* in the *B. tabaci* nymph parasitized by *E. sophia*

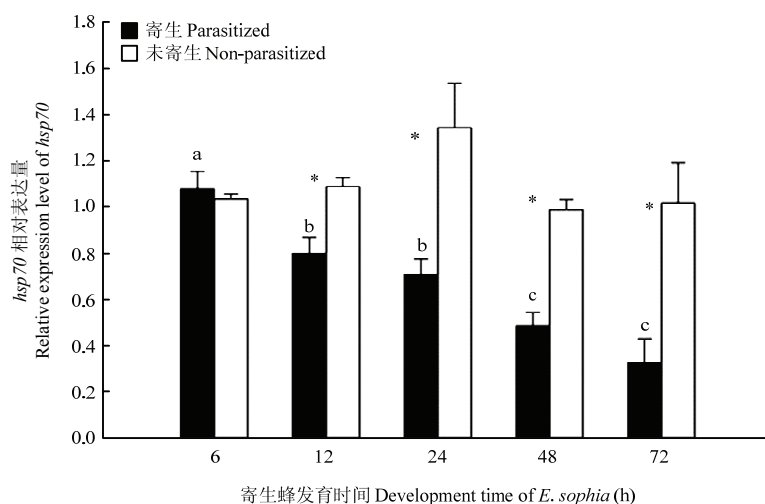


图 4 被浅黄恩蚜小蜂寄生后烟粉虱体内 *hsp70* 的表达水平

Fig. 4 mRNA expression levels of *hsp70* in the *B. tabaci* nymph parasitized by *E. sophia*

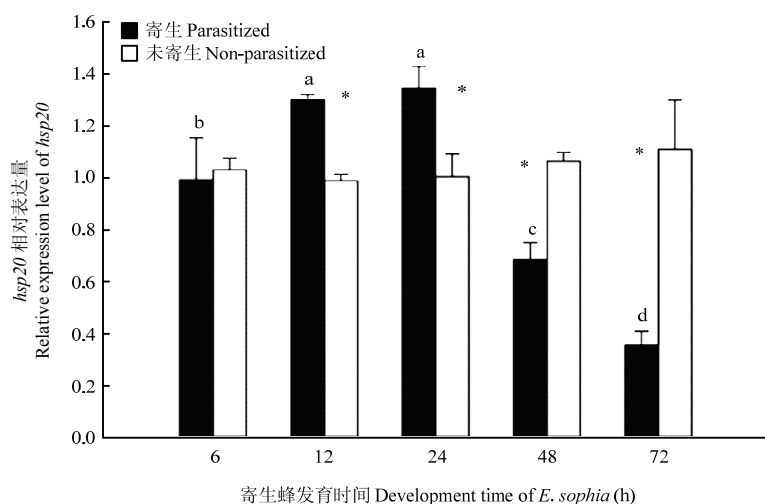


图 5 被浅黄恩蚜小蜂寄生后烟粉虱体内 *hsp20* 的表达水平

Fig. 5 mRNA expression levels of *hsp20* in the *B. tabaci* nymph parasitized by *E. sophia*

3 讨论

海藻糖是生物体能源储备的主要形式,且在高温、高寒等条件下也可保护细胞活性,提高生物体抵御伤害的能力^[12,24]。热激蛋白是一类分子伴侣,在生物体内主要起保护作用,使生物体免受逆境胁迫的伤害^[6]。HSP90、HSP70 和 HSP20 分别属于热激蛋白 3 个家族的成员。其中, HSP90 和 HSP70 在生物体中比较常见,因而研究也最多。人们通过对这些基因进行克隆、进化树分析、滞育研究、逆境诱导表达分析以及探索重要物种中热激蛋白的种类,从而了解热激蛋白的功能和本质^[25-29]。本研究同时探索海藻糖和热激蛋白在寄生活动中的表现差异,旨在更加全面地探讨这两种物质在寄生蜂寄生寄主昆虫过程中的应激反应以及潜在的作用。

本研究结果表明寄生蜂寄生改变了寄主体内海藻糖的含量、海藻糖酶的活性以及 3 种热激蛋白基因的表达水平。被浅黄恩蚜小蜂寄生后,烟粉虱体内海藻糖含量先升高后降低,而海藻糖酶的活性变化则大体上与其相反,这与海藻糖酶主要起分解海藻糖的作用一致。Dahlman 和 Vinson^[15]发现红足侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* Cresson 的寄生可提高烟蚜夜蛾幼虫血淋巴中的海藻糖水平,而樊金华等^[17]证明油松毛

虫 *Dendrolimus tabulaeformis* 被布氏白僵菌 *Beauveria brongniartii* (Sacc.) 感染后血淋巴中海藻糖含量显著降低, 说明寄生蜂-寄主互动机制的复杂性与差异性。研究表明, 寄生蜂主要通过控制糖类、脂类和蛋白质等营养物质的水平对寄主的营养代谢进行调控^[30,31]。在本研究中, 寄主烟粉虱海藻糖含量在寄生后 24 h 达到最大值, 推测可能是应激反应刺激了海藻糖的保护功能, 也可能是寄生蜂对营养物质需求的结果。24 h 后, 海藻糖含量开始不断降低, 海藻糖酶活性不断升高, 说明海藻糖被大量分解成葡萄糖, 为生物体提供能量。周长青等^[32]证实浅黄恩蚜小蜂的卵期约为 48 h, 由此推算, 寄生蜂从卵期就开始对寄主的营养代谢进行调控, 通过逐步改变海藻糖含量, 最终达到获取能量维持自身发育的目的。

3 种热激蛋白基因在寄生蜂的诱导下也分别出现差异表达。其中, *hsp90* 的表达量与寄生时间成正比, *hsp70* 的表达量与寄生时间成反比, *hsp20* 的表达量则出现先升高后降低的趋势。该结果与 Shim^[18]和 Zhu 等^[19]的并不一致, 可能与试验对象的不同有关。值得注意的是, 无论是上调还是下调, 这 3 种热激蛋白基因均是在寄生后 12 h 开始出现差异表达, 与 Zhu 等^[19]的结果基本一致。我们发现, 3 种热激蛋白基因出现差异表达的起始时间点与海藻糖及海藻糖酶基本相同, 这说明寄生蜂卵在发育到 12 h 时可能有着较多的形体或生理变化, 足够引起寄主产生应激反应, 该时间点或许可作为寄生蜂调控研究的一个参考。然而为何 *hsp90* 被诱导高表达, 而 *hsp70* 和 *hsp20* 被抑制表达, 目前还没有较好的解释, 这可能与热激蛋白自身的性质与功能有关, 需要进一步地探讨。本研究证明海藻糖和热激蛋白参与了寄生蜂与寄主互作体系, 并帮助我们进一步了解二者在这一互作过程中所扮演的角色。然而, 本研究并没有再进一步研究海藻糖酶基因在转录水平上的变化或是葡萄糖总含量的变化, 因此在揭示海藻糖在寄生蜂与寄主互作机制中的作用时, 论据相对薄弱。此外, 尽管很多研究都证实热激蛋白参与了寄主的免疫反应, 但真正研究不同热激蛋白家族在这一过程中具体作用方式的却很少, 该方面也有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱家颖, 叶恭银, 胡萃. 寄生蜂调控寄主分子机制的研究进展[J]. 植物保护学报, 2008, 35(6): 563-568.
- [2] 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景[J]. 生物化学杂志, 1987, 3(1): 11-18.
- [3] Asgari S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: Their role in host-parasite interactions[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2006, 61(3): 146-156.
- [4] Backage N E, Gelman D B. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control[J]. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 299-330.
- [5] Holt H L, Aronstein K A, Grozinger C M. Chronic parasitization by *Nosema microsporidia* causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*)[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 799.
- [6] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61: 243-282.
- [7] Ke S S. Heat shock proteins[J]. Biology Teaching, 2007, 32(6): 7-9.
- [8] Pockley A G. Heat shock proteins as regulators of the immune response[J]. The Lancet, 2003, 362(9382): 469-476.
- [9] Udono H, Srivastava P K. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90 and hsp70[J]. Journal of Immunology, 1994, 152: 5398-5403.
- [10] Krone P H, Sass J B, Lele Z. Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53(1): 122-129.
- [11] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. Preservation of membranes in Anhydrobiotic organisms: The role of trehalose[J]. Science, 1984, 223(4637): 701-703.
- [12] Thompson S N. Trehalose- the insect 'blood' sugar[J]. Advances in Insect Physiology, 2003, 31: 205-285.
- [13] Hottiger T, Boller T, Wiemken A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts[J]. FEBS Letters, 1987, 220(1): 113-115.
- [14] 于彩虹, 卢丹, 林荣华, 等. 海藻糖——昆虫的血糖[J]. 昆虫知识, 2008, 45(5): 832-837.
- [15] Dahlman D L, Vinson S B. Effect of calyx fluid from an insect parasitoid on host hemolymph dry weight and trehalose content[J]. Journal of Invertebrate

- Pathology, 1977, 29: 227-229.
- [16] Bischof C. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1995, 112(1): 87-92.
- [17] 樊金华, 谢映平, 薛皎亮, 等. 感染布氏白僵菌后油松毛虫血淋巴中海藻糖酶活性、海藻糖和葡萄糖含量的变化[J]. 昆虫学报, 2013, 56(8): 864-869.
- [18] Shim J K, Ha D M, Nho S K *et al.* Up-regulation of heat shock protein genes by envenomation of ectoparasitoid *Bracon hebetor* in larval host of Indian meal moth *Plodia interpunctella*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 97: 306-309.
- [19] Zhu J, Wu G, Ye G, *et al.* Heat shock protein genes (hsp20, hsp75 and hsp90) from *Pieris rapae*: Molecular cloning and transcription in response to parasitization by *Pteromalus puparum*[J]. Insect Science, 2013, 20: 183-193.
- [20] 罗晨, 姚远, 王戎疆, 等. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型[J]. 昆虫学报, 2002, 45(6): 759-763.
- [21] 李元喜, 罗晨, 周长青, 等. 烟粉虱两种寄生蜂生物学特性及寄主竞争关系研究[J]. 昆虫学报, 2008, 51(7): 738-744.
- [22] Ge L, Zhao K, Huang L, *et al.* The effects of triazophos on the trehalose content, trehalase activity and their gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2011, 100(2): 172-181.
- [23] Tatum N, Singtripop T, Tungjitwitayakul J, *et al.* Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(8): 788-795.
- [24] 陈鹏, 肖琳, 史小丽, 等. 胞内海藻糖在 CP02 菌降解对苯二甲酸中的作用[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 977-980.
- [25] Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, *et al.* Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapauses and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2006, 63(1): 36-47.
- [26] 牟国鹏, 陈斌, 何正波. 黑腹果蝇热激蛋白基因家族的生物信息学分析[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2011, 28(3): 10-17.
- [27] Rinehart J P, Li A Q, Yocum G D, *et al.* Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapauses[J]. PNAS, 2007, 104(27): 11130-11137.
- [28] Feder M E, Blair N, Figueras H. Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae[J]. Functional Ecology, 1997, 11(1): 90-100.
- [29] 王欢, 李凯, 方琦, 等. 蝶蛹金小蜂热激蛋白家族基因表达与热保护功能[J]. 昆虫学报, 2012, 55(8): 903-910.
- [30] 王方海, 古德祥, 温瑞贞. 寄生蜂对寄主生长发育的调控[J]. 昆虫天敌, 2000, 22(4): 177-181.
- [31] 汪海燕, 余虹, 万志伟, 等. 菜蛾盘绒茧蜂对寄主小菜蛾幼虫营养的调节和利用[J]. 昆虫学报, 49(4): 574-581.
- [32] 周长青, 李元喜, 刘同先, 等. 浅黄恩蚜小蜂雌蜂的个体发育及其寿命[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 113-118.

封面说明：浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia* (Girault & Dodd)

图一左侧为浅黄恩蚜小蜂雄成蜂，右侧为雌成蜂；图二左侧为浅黄恩蚜小蜂雌蜂在带有发育至蛹期雌蜂的烟粉虱三龄若虫上产卵，右侧为雌蜂在未被寄生的烟粉虱三龄若虫上孤雌产雄；图三左侧为寄生 12 h 后发育的浅黄恩蚜小蜂雌卵，右侧为寄生 12 h 后发育的浅黄恩蚜小蜂雄卵；图四左侧为浅黄恩蚜小蜂的雌虫蛹，右侧为被雄卵寄生的烟粉虱若虫（浅黄恩蚜小蜂雌蜂已发育至预蛹期）。

浅黄恩蚜小蜂是烟粉虱的优势寄生蜂，王颖颖等（正文见 297~304 页）研究了浅黄恩蚜小蜂寄生烟粉虱后，寄主体内海藻糖含量、海藻糖酶活性的变化以及 3 种热激蛋白基因的转录水平。除了探究二者在寄生蜂寄生寄主过程中所起的作用外，还探究了二者之间在保护功能上的联系性，为进一步明确寄主的自我保护机制和寄生蜂调控寄主代谢机制奠定了基础。