中华甲虫蒲螨寄生双条杉天牛幼虫血淋巴变化*

周英梅** 温俊宝*** 苓建强

(北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083)

Changes on the total protein content in hemolymph of *Semanotus bifasciatus* after infected by *Pyemotes zhonghuajia*.

ZHOU Ying-Mei**, WEN Jun-Bao***, LING Jian-Qiang (*Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education*, *Beijing Forestry University*, Beijing 100083, China)

Abstract Changes in the total protein content in hemolymph of the mite *Pyemotes zhonghuajia* Yu and Zhang (Acari: Pyemotidae) and the beetle *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae) after parasitization by *P. zhonghuajia* were assayed. Third-instar larvae of *S. bifasciatus* and mature *P. zhonghuajia* were placed in the cuvettes and the foraging behavior of *P. zhonghuajia* observed carefully over one generation. The total protein content of the haemolymph of the beetle larvae and mites was measured every 12 hours using the Brodford method. The results show that total protein in mite hemolymph increased while that of the beetle larvae declined. The maximum total haemolymph protein in *P. zhonghuajia* was 61.78%, which was recorded after 36 h and 48 h. A significant difference in the haemolymph protein of the mites was apparent after 24 hours. The haemolymph content of *S. bifasciatus* changed significantly compared to the control after 36 h to 48 h, the period in which feeding by mites caused the beetle larvae to became paralytic. This suggests that the effect of parasitiztion by *P. zhonghuajia* on *S. bifasciatus* was most extreme 36 to 48 h after exposure. After 12 h the haemolymph protein of the beetle larvae was slightly higher than that of the control, which suggests that they may have an initial immune reaction against attack by mites.

Key words *Semanotus bifasciatus*, *Pyemotes zhonghuajia*, hemolymph, total protein

摘 要 为了解中华甲虫蒲螨 *Pyemotes zhonghuajia* Yu and Zhang 对双条杉天牛 *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky)的致死过程,将已发育成熟的中华甲虫蒲螨膨腹体移入放有双条杉天牛 2 龄幼虫的玻璃指形管中,在蒲螨的一个生活史 60 h 内,观察其取食行为,并在移入后每隔 12 h 用考马斯亮蓝法分别测定天牛幼虫和蒲螨血淋巴中总蛋白质含量。结果显示,蒲螨蛋白含量总体呈现上升的趋势,在 36 ~ 48 h 上升幅度最大,达 61.78%;而天牛幼虫血淋巴总蛋白质含量则呈总体下降趋势,与对照相比,在 36 ~ 48 h之间下降最为明显;蒲螨总蛋白质含量在 24 h 后处理组与对照组差异均为极显著,天牛幼虫总蛋白质含量在 48 h 后处理组与对照组差异显著,这表明蒲螨在 24 h 已搜寻到寄主开始取食,且取食效果明显,而天牛幼虫在 48 h 后表现为麻痹致死,36 ~ 48 h 蒲螨取食对天牛致死起关键作用。12 h 时处理组的双条杉天牛幼虫总蛋白质含量比对照组略高,推测是由于幼虫对外寄生物蒲螨具有一定的免疫防御反应。

关键词 双条杉天牛,中华甲虫蒲螨,血淋巴,总蛋白质

双条杉天牛 *Semanotus bifasciatus* (Motschulsky)是一种毁灭性蛀干害虫,可导致侧柏、桧柏等树木整株枯死[1];由于隐蔽危害,防治困难。近年来发现中华甲虫蒲螨 *Pyemotes zhonghuajia* Yu and Zhang[2]可寄生其幼虫,且

* 资助项目:北京市教委科研基地共建项目、中央高校基本科研业务费专项基金。

** E-mail:shanhufeng@163.com

*** 通讯作者,E-mail:wenjb@bjfu.edu.cn

收稿日期:2010-03-02,修回日期:2010-06-27

对低龄幼虫作用效果较好[3]。该蒲螨还可以寄生六星黑点豹蠹蛾[4]、国槐叶柄小蛾[5]、小蜂、光肩星天牛等幼虫，二齿茎长蠹、杨干象成虫及肤小蠹的卵[6]。蒲螨搜寻到寄主后首先以毒素对寄主进行永久性麻痹，后以寄主血淋巴为食[7]，最终致使寄主死亡。

在昆虫的开放式循环系统中，血淋巴是代谢的重要场所，也是代谢过程中各种物质储存和交换的场所[8]。血淋巴在昆虫的防御、免疫、损伤应答、抗冻[9]等方面都起到重要作用。昆虫血淋巴含有多种蛋白质，包括形成组织所需蛋白、供应卵母细胞发育的卵黄原蛋白、激素和脂类的载体蛋白、多种酶等，这些蛋白质与组织形成和物质代谢有关[10]。目前已对蒲螨毒素进行了基因同源类似序列克隆与分析研究[11]，但对蒲螨注入毒素后其寄主血淋巴变化尚未见报道。本文从血淋巴蛋白质含量变化入手，探索这种变化与蒲螨寄生并致死寄主的关系，为进一步明确中华甲虫蒲螨致死寄主机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫来源与饲养

双条杉天牛幼虫取自北京林业大学森保研究室接虫新鲜侧柏木段，室内在生化培养箱(25 ± 1)℃条件下用新鲜侧柏木屑饲养；中华甲虫蒲螨由河北省昌黎果树研究所提供，在(27 ± 1)℃、51% ± 5% RH 的生化培养箱中用双条杉天牛幼虫饲养。

1.2 试剂与器材

考马斯亮蓝 G—250 染料试剂：称 100 mg 考马斯亮蓝 G—250，溶于 50 mL 95% 乙醇后，再加入 120 mL 85% 的磷酸，用水稀释至 1 L；牛血清白蛋白：Sigma 进口分装[12]；以上试剂均为分析纯。UV-756 型分光光度计，旋涡混合器，微量进样器等。

1.3 蒲螨寄生行为观察

将已发育成熟的中华甲虫蒲螨膨腹体移入放有双条杉天牛 2 龄幼虫的玻璃指形管中，待成螨出现后，观察记录蒲螨搜寻寄主、取食等行为活动特征。

1.4 血淋巴中总蛋白质含量测定

1.4.1 双条杉天牛幼虫血淋巴样品的采集与制备 向放置有双条杉天牛 2 龄幼虫的玻璃指形管中移入 10 头大小均一、发育阶段相同的成熟蒲螨膨腹体，在接入后不同时间(0、24、36、48、60 h)对昆虫进行清洗、体表消毒、麻醉[13]，然后切开背血管，用微量进样器收集血淋巴 5 μL迅速放入预冷的缓冲液[14]（PH8.0，含 0.01 mol/LTris-HCl、0.02 mol/LEDTA、少量的 PMSF）。为抑制血淋巴接触空气引起黑化反应，还要加入少许苯基硫脲晶体，或将血淋巴直接收集到$(NH_4)_2SO_4$饱和溶液中，最后的饱和度调节到 50%[15]，再加入预冷缓冲液稀释，作为待测样品。以未被寄生的 2 龄天牛幼虫作为对照。

1.4.2 蒲螨血淋巴样品的采集与制备 由于蒲螨体形很小，故采用刺破法制备血淋巴样品，每次在显微镜下随机取出蒲螨 10 头，用昆虫针将蒲螨刺破并研磨，收集到的血淋巴样品处理方法同上。对照组取膨腹体破裂后的爬行成螨 10 头。

1.4.3 血淋巴中总蛋白质含量测定 采用 Bradford 法[16]，建立牛血清白蛋白标准曲线，取 1 mL 待测样品，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G—250，立即在涡旋混合器上混合（不要太剧烈，以免产生大量气泡而难以消除），室温(25℃)放置 2 ~ 5 min，比色皿比色，用 UV-756 型分光光度计于 595 nm 处检测蛋白质的含量。重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 蒲螨取食特点及对寄生入侵部位的选择

将成熟蒲螨膨腹体放入指形管 12 h 后未见有爬行成螨，24 h 后指形管内壁出现爬行成螨，成螨先是在天牛幼虫体表爬行，然后试探性地叮咬幼虫，使天牛幼虫进入麻痹状态利于取食，但此时成螨并未开始固定取食，在叮咬后会重新寻找更合适的寄生部位，从而使幼虫体表出现深褐色的“叮咬”斑点。在叮咬后成螨腹

部开始膨大,即“膨腹”出现并逐渐变大,当“膨腹”部分体积相当于其它部分体积的 2 ~ 3 倍时开始固定取食。初期固定部位多在节间膜处,后期在其它部位也有寄生。

2.2　蒲螨寄生双条杉天牛幼虫血淋巴总蛋白质含量变化

2.2.1　双条杉天牛幼虫在移入中华甲虫蒲螨后血淋巴中总蛋白质含量变化　处理后的天牛幼虫血淋巴中总蛋白质含量与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。移入成熟蒲螨膨腹体后,在 12 h 和 24 h,天牛幼虫血淋巴中总蛋白质含量高于对照组,36 h 时处理组低于对照组,但差异不显著($P > 0.05$);48 h 后处理组与一直处于下降状态的对照组差异显著($P < 0.05$);36 ~ 48 h 处理组下降幅度最大(图 1)。

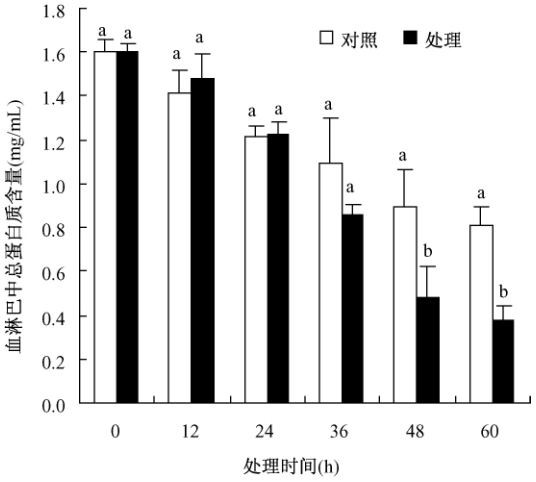

图 1　双条杉天牛幼虫总蛋白含量随时间的变化

注:字母不同表示某一时刻处理组与对照组相互间差异显著($\alpha = 0.05$)。

表 1 列出了天牛幼虫在处理不同时间的总蛋白质含量,对照组内 24 h 相比 0 h 已显著下降,而处理组内 24 h 相比 0 h 也已显著下降,但 24 h 处理组与对照组差异不显著,这种差异在 48 h 显现出来,说明天牛幼虫对于蒲螨初期较少量的取食表现不明显,只有在蒲螨大量取食时才表现出显著差异;在处理组内,36 h 相比 24 h 差异显著,48 h 相比 36 h 差异显著,而在同时间段内的对照组则差异不显著,说明蒲螨取食在 36 h 已开始明显影响天牛幼虫血淋巴中的总蛋白质含量,36 ~ 48 h 时间段天牛幼虫受蒲螨寄生取食影响最大。

表 1　双条杉天牛幼虫总蛋白含量

处理时间(h)	对照(mg/mL)	处理(mg/mL)
0	1.605 ± 0.050 a	1.605 ± 0.050 a
12	1.417 ± 0.105 ab	1.483 ± 0.107 ab
24	1.219 ± 0.041 bc	1.228 ± 0.049 b
36	1.096 ± 0.207 bcd	0.860 ± 0.049 c
48	0.898 ± 0.164 cd	0.483 ± 0.141 d
60	0.813 ± 0.081 d	0.379 ± 0.059 d

注:表中数据为平均值 ± 标准误;同列字母不同表示同一组内不同时间差异显著($\alpha = 0.05$)。

2.2.2　蒲螨血淋巴中总蛋白质含量变化　处理后的中华甲虫蒲螨血淋巴中总蛋白质含量与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。在处理后 0 和 12 h 蒲螨处理组与对照组差异不显著($P > 0.05$),但在 24 h 到实验结束处理组与一直处于下降状态的对照组差异均为极显著($P < 0.01$)(图 2),说明在 24 h 时蒲螨取食已经显著影响蒲螨血淋巴中的总蛋白质含量;36 ~ 48 h蒲螨总蛋白含量上升幅度最大,上升了 61.78%,说明此时间段内蒲螨取食效果明显,这也符合蒲螨的生活史规律,即“膨腹”正在快速膨大,且此时天牛已麻痹不动更利于成螨生长、取食;60 h 时蒲螨完成一代。蒲螨和天牛幼虫的血淋巴总蛋白质含量比较见表 2,在处理组内,36 h 较 24 h 差异显著,但在同时间段内的对照组差异不显著,说明蒲螨取食已明显影响蒲螨总蛋白质含量。

表 2　中华甲虫蒲螨总蛋白含量

处理时间(h)	对照($\times 10^{-3}$ mg/mL)	处理($\times 10^{-3}$ mg/mL)
0	0.356 ± 0.031 a	0.356 ± 0.031 a
12	0.289 ± 0.015 ab	0.339 ± 0.020 a
24	0.217 ± 0.042 bc	0.439 ± 0.080 b
36	0.172 ± 0.015 bc	0.594 ± 0.039 c
48	0.122 ± 0.020 c	0.961 ± 0.073 c
60	0.111 ± 0.034 c	1.061 ± 0.059 c

注:同列字母不同表示某一时刻处理组与对照组相互间差异极显著($\alpha = 0.01$)。

3　讨论

昆虫在漫长的演化过程中形成了对外源异

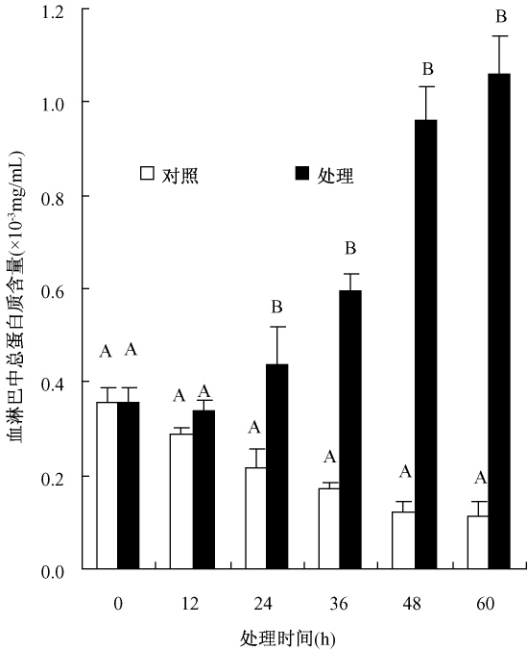

图 2 蒲螨血淋巴总蛋白含量随时间的变化

注:字母不同表示某一时刻处理组与对照组相互间差异极显著($\alpha = 0.01$)。

物侵入时的独特免疫机制,其中在体液免疫机制中,起主要作用的是血淋巴中的抗菌肽和蛋白[17,18]。如桑天牛幼虫血细胞对外界病原微生物如病原真菌等有明显的免疫防御反应,对侵入体内的白僵菌的菌丝段具有吞噬和囊包作用[19]。周婷等也发现被狄斯瓦螨侵染后的意蜂其血淋巴总蛋白质含量明显高于健康意蜂,认为螨侵染意蜂会使其产生防御反应[20]。在蒲螨寄生后 12 h 时,处理组的双条杉天牛幼虫总蛋白质含量比对照组略高,则可能是双条杉天牛幼虫对外寄生物蒲螨具有一定的免疫防御反应。

蒲螨在寄生双条杉天牛幼虫的过程中,二者之间是相互作用的。随着时间推移,蒲螨将毒素注入天牛体内,毒素作用导致天牛幼虫麻痹;蒲螨开始大量取食后即进入急速生长阶段,总蛋白质含量上升比较快,而天牛幼虫血淋巴中总蛋白质含量明显下降。但由于天牛个体营养所限,在蒲螨完成一代后继续繁殖取食血淋巴,就可能会出现蒲螨个体间相互竞争营养物质而死亡的现象,最终导致所有蒲螨因缺乏营养物质逐渐变干,成为空壳。

中华甲虫蒲螨寄生双条杉天牛幼虫后在 24 h 即与对照组表现出差异极显著($P < 0.01$),相比之下,被中华甲虫蒲螨取食的天牛幼虫表现出的蛋白质含量下降时间则比较滞后。测定二者蛋白质含量只能从一定程度上反映中华甲虫蒲螨的取食情况。为了更明确地探讨蒲螨寄生对血淋巴的影响,在测定总蛋白质含量的同时,还需测定血淋巴酯酶活性和蒲螨侵染对血淋巴酯酶同工酶的影响,且要寻找更多寄主进行试验测定。

中华甲虫蒲螨是一类外寄生性天敌,由于其寄主广泛,容易饲养等优点,对防止蛀干害虫和地下害虫有很大潜能[21]。目前国内外研究主要集中在毒素提取、纯化和毒素基因转移方面,寄生机制方面的研究有待于进一步深入,如蒲螨如何对寄主个体、生境等进行选择,寄主神经对体内物质的调控作用,蒲螨寄生时向寄主体内注射毒素,如何导致寄主神经麻痹或肌肉麻痹等,此外,判断寄主麻痹和致死界限的标准也值得探讨。

致 谢 衷心感谢河北省昌黎果树研究所于丽辰研究员提供中华甲虫蒲螨源。

参 考 文 献

1 刘杰,刘发邦,王绍文,等. 双条杉天牛生物学特性观察与防治. 河北林业科技,2004,**6**:49 ~ 50.

2 Yu L. C.,Zhang Z. Q. Two new species of *Pyemotes* closely related to *P. tritici* (Acari: Pyemotidae),*Zootaxa*,2010,in press.

3 张佐双,熊德平,程炜. 利用天敌蒲螨防治柏树蛀干害虫双条杉天牛. 中国园林,2004,**2**:75 ~ 77.

4 张佐双,熊德平,程炜. 寄生性天敌蒲螨对几种蛀干害虫的控制作用. 中国生物防治,2008,**24**(1):1 ~ 6.

5 贺丽敏,蕊焦,于丽辰,等. 应用中华甲虫蒲螨防治钻蛀性害虫. 中国科技成果,2009,(10):59.

6 于丽辰,贺丽敏,许长新. 肤小蠹蒲螨的生物学及温度对其生长发育、繁殖的影响. 走向 21 世纪的中国昆虫学. 北京:中国科学技术出版社,2000. 1 031 ~ 1 032.

7 Bruce W. A.,Wrensch D. L. Reproductive potential,sex ratio,and mating efficiency of the straw itch mite (Acari: Pyemotidae). *J. Econ. Entomol.*,1990,**83**(2):384 ~ 391.

8 郭郛,忻介六. 昆虫学试验技术. 北京:科学出版社,1981. 165 ~ 166.

9 赵章武. 昆虫抗冻机理研究进展. 昆虫学报,1997,**4**(3):265 ~ 276.

10 张国洲,王亚维,徐汉虹. β ~ 谷甾醇等化合物对昆虫血淋巴蛋白质含量的影响. 湖北农学院学报,2000,**20**(3):201 ~ 202.

11 韩继成,贺丽敏,焦蕊,等. 肤小蠹蒲螨毒素基因同源类似序列的克隆和分析. 河北农业科学,2008,**12**(1):72 ~ 74.

12 田铃,稽保中,刘曙雯,等. 桑天牛成虫交配后血淋巴和生殖系统内可溶性总糖和蛋白质含量的变化. 昆虫学报,2008,**51**(1):96 ~ 101.

13 王岩,马纪,刘小宁. 昆虫血淋巴的收集技术与方法. 昆虫知识,2009,**46**(1):147 ~ 151.

14 高志华,杨小龙,刘敬泽,等. 长角血蜱雌蜱感染嗜菌异小杆线虫后血淋巴的变化. 昆虫学报,2006,**49**(1):34 ~ 37.

15 Lu Z. ,Jiang H. Expression of *Manduca sexta* serine proteinase homology precursors in insect cells and their proteolytic activation. *Insect Biochem*. ,2008,**38**:89 ~ 98.

16 Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. ,1976,**72**:248 ~ 254.

17 蒋红波,王进军. 昆虫免疫防御系统的限制因素. 现代生物医学进展,2006,**6**(2):86 ~ 90.

18 王荫长. 昆虫生物化学. 北京:中国农业出版社,2001. 245 ~ 247.

19 王达,苏筱雨,黄大庄,等. 桑天牛幼虫血淋巴对球孢白僵菌的防御反应. 林业科学,2009,**45**(4):83 ~ 87.

20 周婷,姚军,王强,等. 微孢子虫和狄斯瓦螨分别侵染后的意蜂血淋巴蛋白质含量变化. 昆虫学报,2004,**47**(4):530 ~ 533.

21 马立芹,温俊宝,许志春,等. 寄生性天敌蒲螨研究进展. 昆虫知识,2009,**46**(3):366 ~ 371.