

六种赤眼蜂酯酶同工酶的比较研究

曹关良 陆文卿
(上海师范学院)

郎 所
(华东师范大学)

摘 要

1. 应用pH8.3 Tris—甘氨酸缓冲液的聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳对广赤眼蜂 *T. evanescens*、拟澳洲赤眼蜂 *T. confusum*、短管赤眼蜂 *T. pretiosum*、卷蛾赤眼蜂 *T. cacoecia*、菜白蝶赤眼蜂 *T. pieris*、松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi* 6种赤眼蜂的酯酶同工酶有高度的分辨力。6种已知赤眼蜂的酯酶同工酶酶谱在分带数目, 酶带泳动率及酶谱扫描都显示了一定的差异。说明在形态分类上存在的种间差异, 在酯酶电泳图上也同样有差异。

2. 拟澳洲赤眼蜂和松毛虫赤眼蜂, 在寄主、温度、性别不同的条件下, 其各自酯酶酶谱的分带数目和泳动率完全一致。

3. 拟澳洲赤眼蜂、松毛虫赤眼蜂两个蜂种的蛋白电泳图以及苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶同工酶酶谱均无明显差异。

赤眼蜂为生物防治中广泛应用的寄生蜂种, 但由于体形小, 体色又随发育环境而变化, 给分类鉴定带来一定的困难, 经过各国学者广泛研究^[1-12], 初步认为雄性外生殖器的形态特征是种间重要的分类特征^[2,3,6,7,10,11]。但雄性外生殖器极小, 差别有时不显著, 尚需应用遗传杂交方法进行最后确定^[7,13], 因此对赤眼蜂的分类方法尚有进一步研究的必要。

近年来, 生物化学技术已逐渐应用到分类学方面^[14-16]。本文应用凝胶电泳方法对拟澳洲赤眼蜂等6种赤眼蜂的若干生化指标进行了初步的比较研究。

一、材料与方法

本文试用赤眼蜂种均由广东省农科院刘志诚提供。共试用6种赤眼蜂: 1. 广赤眼蜂 *Trichogramma evanescens* (西德引进), 2. 拟澳洲赤眼蜂 *Trichogramma confusum*, 3. 短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* (美国引进), 4. 卷蛾赤眼蜂 *Trichogramma cacoecia* (西德引进), 5. 菜白蝶赤眼蜂 *Trichogramma pieris* (暂定名), 6. 松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi*。蜂种均在25°C (±1°)、相对湿度保持在80%左右的恒温恒湿箱内培养。

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[17]

本实验用的是垂直平板电泳。电泳仪型号DY-1。

本文1984年3月收到

凝胶板尺寸 $12 \times 19 \times 0.1$ 厘米, 样品槽 1×1.5 厘米, 分离胶浓度为7.5%, 浓缩胶浓度为2.5%, 分离胶高为10厘米, 浓缩胶为2厘米。

称取在 25°C 下以蓖麻蚕卵(用作比较不同温度饲养的蜂种置 15°C 下)培养的蜂种各5毫克, 经 0°C 下麻醉后, 分别加入 $\text{pH}8.3$ Tris—甘氨酸缓冲液100微升, 在冰浴下匀浆, 16000转/分离心, 取上清液50微升, 以溴酚蓝作电泳标记, 用 $\text{pH}8.3$ Tris—甘氨酸为电极缓冲液, 上槽为负极, 下槽为正极, 电流强度30毫安, 电压200—220伏, 电泳时间3—4小时。

聚丙烯酰胺凝胶电泳染色有如下几种: ①蛋白染色^[17]; ②苹果酸脱氢酶染色; ③乳酸脱氢酶染色; ④醇脱氢酶染色(以上三种酶染色方法参照中国科学院生物化学研究所周光宇的方法); ⑤酯酶染色^[18]。

电泳毕, 取出凝胶经蒸馏水冲洗, 在 25°C 下, 以 α 醋酸萘酯和 β 醋酸萘酯溶于丙酮—水溶液(1:1), 再加100毫克坚牢兰, 并用 0.1M $\text{pH}6.5$ 磷酸缓冲液150毫升混合后染色10—15分钟, 待酶带出现后, 用水冲洗脱色^[18]。

2. 酯酶谱扫描

色谱扫描仪型号: CS—910; 样品波长: 550毫微米; 参比波长: 单波; 扫描方式: 线型。

二、结 果

松毛虫赤眼蜂和拟澳洲赤眼蜂蛋白电泳如图1所示。

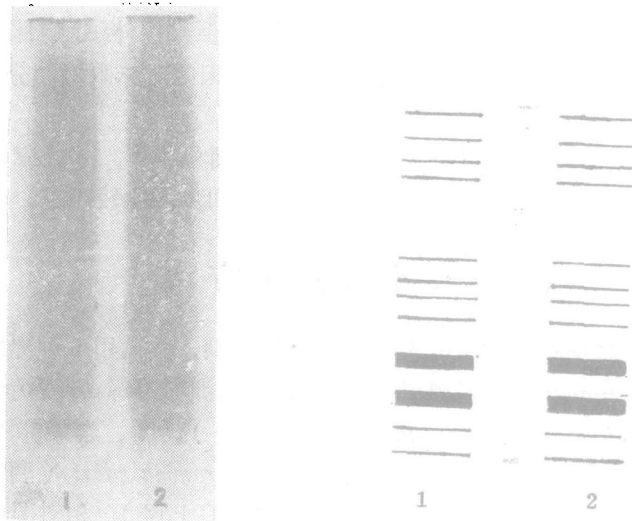


图1 两种赤眼蜂蛋白电泳图

1. 松毛虫赤眼蜂 2. 拟澳洲赤眼蜂

结果表明, 两种赤眼蜂的苹果酸脱氢酶同工酶谱, 均有一条带, 种间无明显差异。乳酸脱氢酶及醇脱氢酶同工酶则均无酶带出现。

6种赤眼蜂的酯酶同工酶电泳结果如图2。其中可分辨酶带最多的有9条,最少为6条,而主要酶带为4至5条。

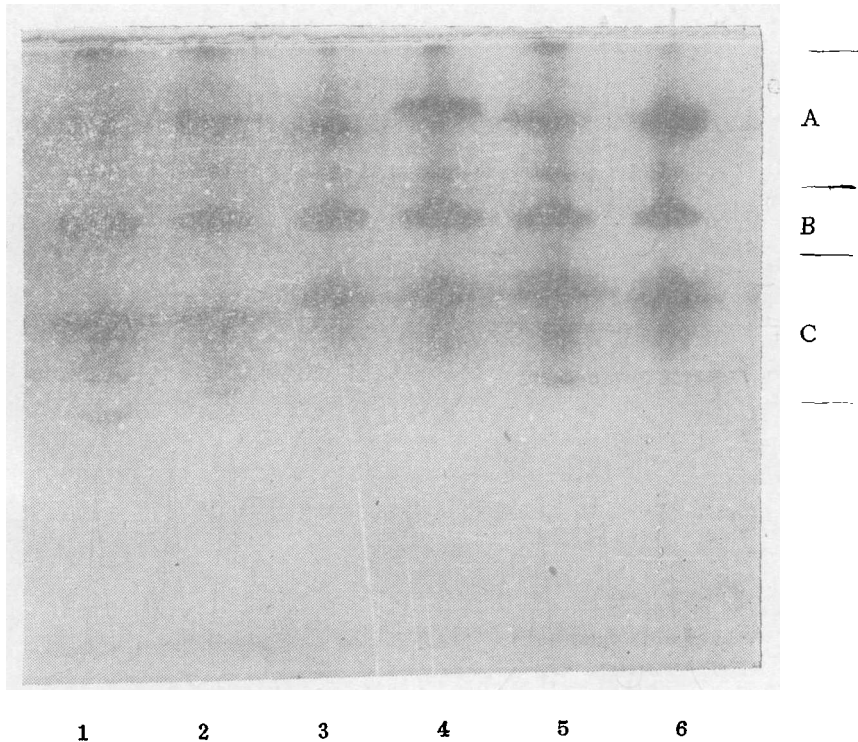


图2 六种赤眼蜂酯酶同工酶酶谱

- 1.广赤眼蜂 2.拟澳洲赤眼蜂 3.短管赤眼蜂
4.卷蛾赤眼蜂 5.菜白蝶赤眼蜂 6.松毛虫赤眼蜂

图2可分为A、B、C三个区域。现分述如下:

- ①广赤眼蜂,可分辨酶带8条,其中A区3条,B区1条,C区4条。
②拟澳洲赤眼蜂,可分辨酶带7条,其中A区2条,B区1条,C区4条。
③短管赤眼蜂,可分辨酶带8条,其中A区3条,B区1条,C区4条。
④卷蛾赤眼蜂,可分辨酶带9条,其中A区3条,B区1条,C区5条。
⑤菜白蝶赤眼蜂,可分辨酶带7条,其中A区2条,B区1条,C区4条。
⑥松毛虫赤眼蜂,可分辨酶带6条,其中A区2条,B区1条,C区3条。

结果表明6种赤眼蜂酯酶同工酶的酶带在数目、位置及活性强弱上均有一定差异。

为表示6种赤眼蜂酶谱间的差异程度,对各酶带的泳动率(Rf值)进行了计算。结果表明6种赤眼蜂酯酶同工酶酶谱仅B区的一条带的泳动率一致,其余二个区的酶带泳动率都存在一定的差异(表1)。

同时,应用色谱扫描仪对各酶谱的酶带进行了扫描(图3)。由图3可见,6种赤眼蜂酯酶同工酶酶谱扫描峰的数目及峰间距离都存在一定的差异。

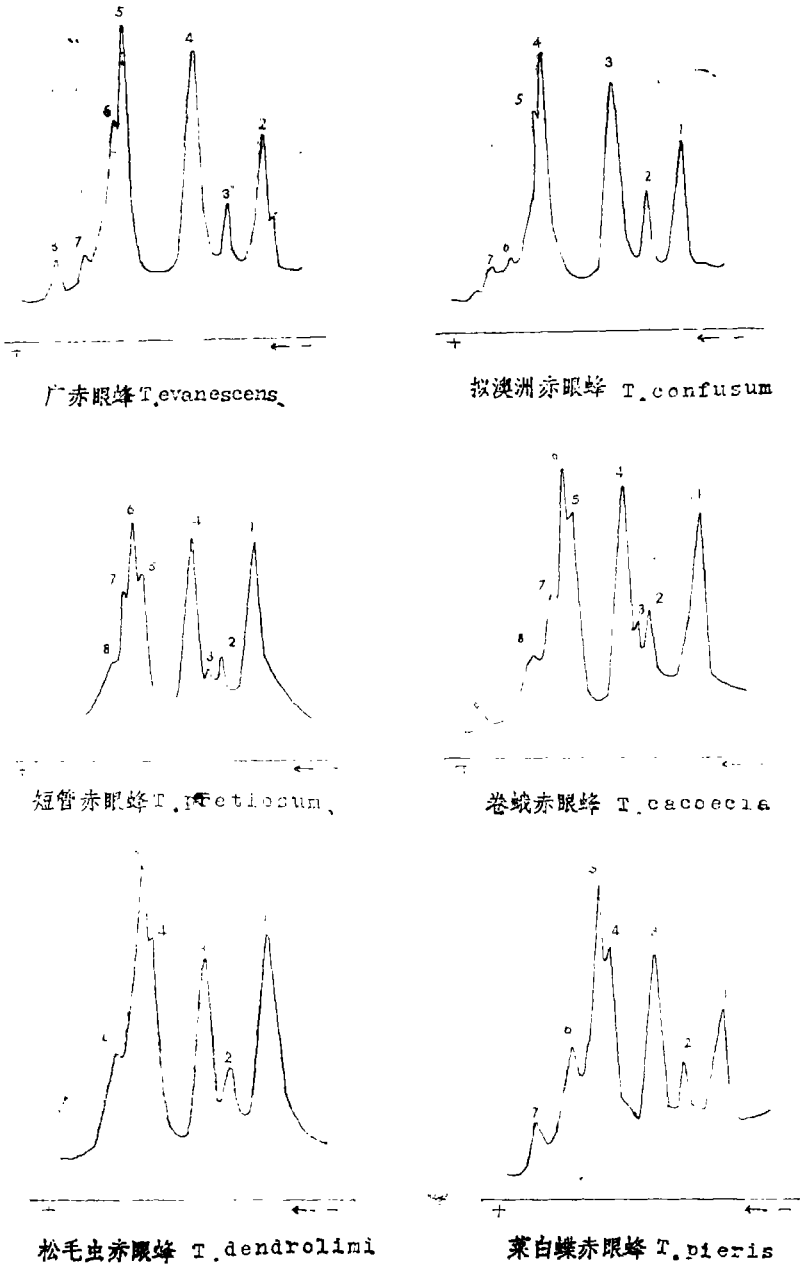


图3 六种赤眼蜂酯酶同工酶谱扫描图

表1 六种赤眼蜂酯酶同工酶酶带的泳动率 (Rf值)

种 谱 带 序 号	名	拟澳洲					松毛虫	
		广赤眼蜂	赤眼蜂	赤眼蜂	赤眼蜂	赤眼蜂	赤眼蜂	赤眼蜂
a ₁ '		0.082						
a ₁		0.103	0.098	0.109	0.078	0.093	0.092	
a ₂		0.168	0.163	0.177	0.170	0.168	0.168	
a ₂ '				0.201	0.198			
b		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
c ₁		0.413	0.410	0.352	0.352	0.336	0.343	
c ₁ '		0.441	0.435					
c ₁ ''		0.511	0.489					
c ₁ '''		0.576	0.522					
c ₂				0.376	0.376	0.364	0.370	
c ₂ '				0.402	0.398	0.421	0.421	
c ₂ ''				0.426	0.438	0.495		
c ₂ '''					0.558			

考虑到用酯酶同工酶酶谱作为种间差异指标是否稳定, 又比较了寄生于不同寄主的松毛虫赤眼蜂和拟澳洲赤眼蜂产卵前及产卵后的酯酶同工酶酶谱以及不同温度培养下的两种雌性赤眼蜂酯酶同工酶酶谱的变化 (图 4—9)。

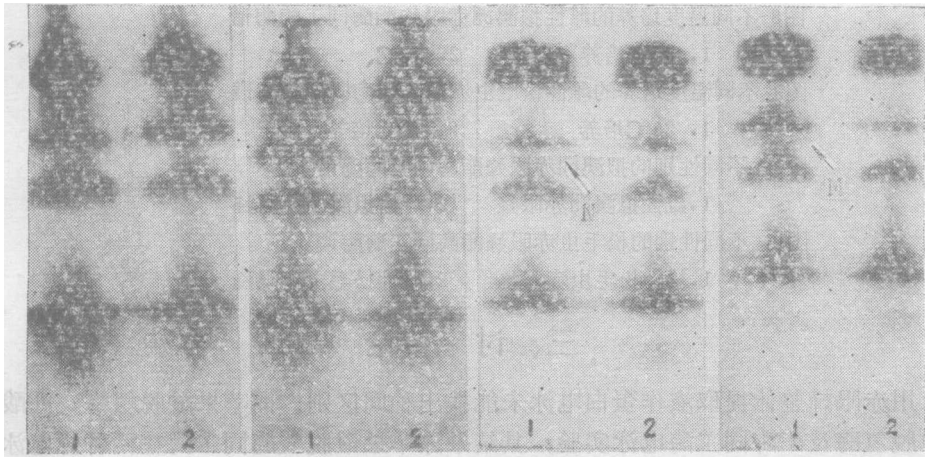


图 4

图 5

图 6

图 7

图4 寄生于柞蚕卵的拟澳洲赤眼蜂产卵前后酯酶同工酶酶谱

1. 为产卵前 2. 为产卵后

图5 寄生于蓖麻蚕卵的拟澳洲赤眼蜂产卵前后酯酶同工酶酶谱

1. 产卵前 2. 产卵后

图6 寄生于柞蚕卵的松毛虫赤眼蜂产卵前后酯酶同工酶酶谱

1. 产卵前 2. 产卵后

图7 寄生于蓖麻蚕卵的松毛虫赤眼蜂产卵前后酯酶同工酶酶谱

1. 产卵前 2. 产卵后

结果表明拟澳洲赤眼蜂和松毛虫赤眼蜂在15℃、25℃两种不同温度下培养,生活史相差20天,而其酯酶同工酶酶谱的分带数目和泳动率完全一致。

不同性别的赤眼蜂酯酶同工酶酶谱也表明拟澳洲赤眼蜂和松毛虫赤眼蜂雌蜂和雄蜂的酯酶同工酶酶谱的分带数目和泳动率完全一致。而雄性酯酶同工酶活性低于雌性,表现在酶带显色较浅(图10, 11)。

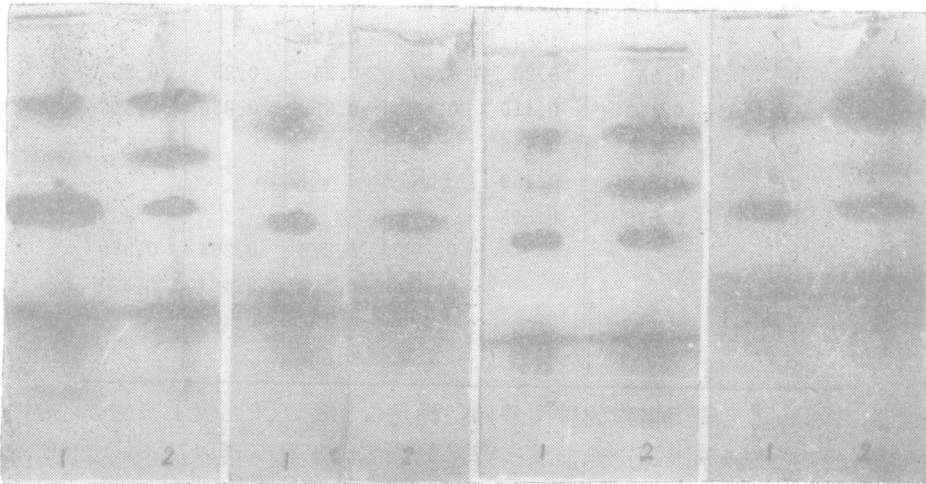


图8

图9

图10

图11

图8 不同温度培养的雌性拟澳洲赤眼蜂酯酶同工酶酶谱

1. 25℃培养

2. 15℃

图9 不同温度培养的雌性松毛虫赤眼蜂酯酶同工酶酶谱

1. 25℃培养

2. 15℃培养

图10 不同性别的拟澳洲赤眼蜂酯酶同工酶酶谱

1. 雄性拟澳洲赤眼蜂

2. 雌性拟澳洲赤眼蜂

图11 不同性别的松毛虫赤眼蜂酯酶同工酶酶谱

1. 雄性松毛虫赤眼蜂

2. 雌性松毛虫赤眼蜂

三、讨 论

应用赤眼蜂整体提取液作蛋白电泳未能找出种间区别。而苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶及酯酶同工酶电泳实验,其结果除苹果酸脱氢酶同工酶在两种蜂电泳图中可见一条酶带外,其余两种酶都无酶带出现。上述情况是否由于样品中该酶的浓度太低,抑或因赤眼蜂体内上述三种酶含量相当低,而本实验方法的灵敏度不够所致,尚有待进一步研究。

而6种赤眼蜂的酯酶同工酶酶谱,泳动率和扫描分析都显示了一定的差异,这种差异和赤眼蜂种间的形态差异是互相吻合的。

通常赤眼蜂的形态特征受生态条件影响较大,为证实这种影响在酯酶同工酶酶谱上是否同样存在,根据本实验结果可以认为,应用酯酶同工酶酶谱比较可不受以下几种情况影响。

1. 不同寄主影响

赤眼蜂能寄生多种昆虫卵内, 寄主不同, 往往个体形态变异很大^[5, 6, 11]。目前一般认为以形态特征进行赤眼蜂分类时, 必须用同一寄主卵培育的蜂种比较, 才为合适。

根据实验结果从图4—7中可看出, 用柞蚕卵和蓖麻蚕卵为寄主分别培养拟澳洲赤眼蜂和松毛虫赤眼蜂再作电泳比较, 同种赤眼蜂虽寄主不同, 但其电泳酶带和泳动率完全一致。因此可认为, 在应用酯酶同工酶酶谱进行赤眼蜂比较时, 即使用不同寄主如柞蚕卵或蓖麻蚕卵, 虽然个体大小差异较大, 但酯酶同工酶酶谱却无影响。

2. 不同温度影响

同种赤眼蜂在不同温度下培养, 其形态会出现不同的变化^[5, 9, 11]。本文用松毛虫赤眼蜂和拟澳洲赤眼蜂于15℃、25℃两种不同温度下培养, 其生活史相差20天, 体色也有明显差异, 但同种赤眼蜂酯酶同工酶酶谱和泳动率却完全一致。由此可见, 在用酯酶同工酶电泳作赤眼蜂种间比较时, 可不必考虑温度影响和生活周期长短。

3. 不同性别影响

赤眼蜂的分类目前主要以雄性外生殖器为主要指标。图10、11显示, 同种赤眼蜂性别虽不同, 但酯酶同工酶电泳图却基本一致。只是雄性的酶带活性低于雌性, 表现为显色较浅。这和Yuichi Tanabe等^[19]报道的雌性蜜蜂和胡蜂组织内的酯酶活性高于雄性的情况是一致的。可以认为, 应用酯酶同工酶凝胶电泳对赤眼蜂种类进行比较时, 无须考虑性别之差异。即使用雌雄混杂材料作出的酶谱也相同, 这为取样提供了方便。

4. 产卵前、后影响

实验结果表明(图4—7), 拟澳洲赤眼蜂产卵前后各条酶带完全一致, 而松毛虫赤眼蜂产卵前比产卵后在A区多了一条不太明显的酶带〔见图6、7(N)、(M)〕。这可能是雌性赤眼蜂产卵前、后生理变化而导致其体内酯酶变化的结果。但鉴于目前只对两种赤眼蜂进行了产卵前、后的比较, 故这方面的工作, 尚待进一步试验。

近年来, 不少学者对不同种昆虫及蛇毒蛋白的酯酶同工酶进行了大量的研究工作^[14, 15, 19, 21—23]。这些研究都为摸索动物的生物化学分类打下了基础。

吉武成美等应用凝胶电泳对家蚕血液酯酶同工酶的研究认为, 酯酶同工酶是直接的基因产物, 并非生理性修饰酶带, 以它作为遗传指标是可靠的^[20]。因而根据酶的特性, 许多人认为在不同生物种属或个体内, 其酶型和酶浓度也是有所不同的, 酶的种属差异特征在动物分类上具有一定的意义。

我们对6种赤眼蜂酯酶同工酶酶谱的比较也证明, 在形态分类上存在的种间差异, 在酯酶同工酶酶谱上同样得到了反映。同时从实验结果来看, 用酯酶同工酶酶谱鉴别赤眼蜂种类, 具有不受寄主、温度等生态条件影响, 也不受蜂种雌、雄之影响的优点。

参 考 文 献

- [1] Hintzeman, U., *Arb. Biol. Reichsanst. Land. Forstwirtschaft*, 14(1925), 225—230.
- [2] Ishii, T., *Kontyu*, 14(1941), 169—76.
- [3] Viggiani, G., *Proc. Int. Congr. Entomol*, 13(1968), 1, 313—15.

- [4] Telenga, N.A.(1959), *Trans. Int. Conf. Insect Pathol. Biol. Contr. Ist, Prague*, 1958, pp. 355—359.
- [5] Quednau, W., *Mitt. Biol. Bundesanstalt Ld—u Forstw*, 100(1960), 13—50.
- [6] Nagarkatti, S., Nagaraja, H., *Bull. Entomol. Res*, 61(1971), 13—31.
- [7] Nagaraja, H., *Orient. Insects*, 7(1973), 2, 275—90.
Nagaraja, H., Nagarkatti, S., *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 75(1973), 3, 288—97.
- [8] 祝汝佐, 中国植物保护科学, 1961年, 160—183.
- [9] 钱永庆、曹瑞麟、龙承德, 江苏农学报, 3 (1964), 2, 81—9.
- [10] 曾省, 昆虫学报, 14(1965), 4, 404—409.
- [11] 庞雄飞、陈泰鲁, 昆虫学报, 17(1974), 4, 441—454.
- [12] 陈泰鲁、庞雄飞, 动物学研究, 2(1981), 4, 333—335.
- [13] Fazaluddin, M., Nagarkatti, S., *Ann. Entomol. Soc Am.*, 64(1971), 6, 1470—71.
- [14] 赵尔宓等, 动物学报, 27(1981), 3, 213—17.
- [15] 鄂卡远等, 两栖爬行动物研究, 5(1981), 14, 87—94.
- [16] 张维强等, 原子能农业应用, 1981, 4, 60—64.
- [17] 薛克强, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 1975.
- [18] 吴少伯, 植物生理通讯, 1979, 1, 30—33.
- [19] Yuichi Tanabe, yoshinori Tamaki and shigeru Nakano, *Japan. J. Genetics*, 45(1970), 6, 425—428.
- [20] 吉武成美, 江口正治, 日蚕杂, 34(1965), 2, 95—97.
- [21] Johnson, F. M., Kanapi, C. G., Richardson, R. H., Wheeler, M. R., Stone, W. S., *Univ Texas Publ*, 6615, 517—32.
- [22] Asperen, K. Van and Mazijk, M. E. Van, *Nature*, 205(1965), 1291—1292.
- [23] Alice M. Trebatoski and Julian F. Haynes, *Am. Ent. Soc. Amer.*, 82, 327—337.

Studies on Comprison of Esterase Isoenzyme of Six Species of Trichogrammatids

Cao Guanliang Lu Wenqing
(Department of Biology, Shanghai
Normal College)

Long So
(Department of Biology, East
China Normal University)

Abstract

Isozymograms of the soluble fractions of the tissue homogenates of these six species Trichogrammatids, viz. *Trichogramma evenescens*, *T. confusum*, *T. protiosum*, *T. cacoecia*, *T. pieris* and *T. dendrolimi*, were studied by the slab polyacrylamide gel electrophoresis in alkaline pH. No differential or clear cut bands were developed for the protein separation, MDH (Malate dehydrogenase), LDH (Lactate dehydrogenase) and ADH (Alcohol dehydrogenase). But differential bands with high resolution as well as the migration velocity and scanning curves were shown on the esterase isoenzymograms for these six species of Trichogrammatids. It was suggested that the esterase isoenzyme analysis might have the potentiality to be applicable for the Taxonomy of Trichogrammatids species if more species were studied and compared.