

## 豌豆蚜取食对蚕豆韧皮部及自身 氨基酸含量的影响

朱玉永<sup>1,2</sup>, 陈立<sup>2</sup>, 王俊刚<sup>1</sup>

(1. 石河子大学农学院, 新疆石河子 832003; 2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**【目的】以植物韧皮部氨基酸含量为指标, 探讨蚜虫取食前后蚕豆韧皮部及蚜虫体内游离氨基酸的变化, 以及蚜虫的生长发育状况, 为揭示蚜虫与寄主之间互作关系提供理论依据。【方法】以邻苯二甲醛(OPA)和氯甲酸-9-芴基甲酯(FMOC)为氨基酸衍生化试剂, 对氨基酸进行在线衍生化反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析。【结果】在蚕豆韧皮部汁液中检测到20种游离氨基酸, 豌豆蚜体内检测到16种。蚕豆和豌豆蚜体内含量最高的氨基酸均是天冬酰胺; 8种必需氨基酸(Essential amino acids, EAA)在蚕豆韧皮部汁液中均能检测到, 并且其含量随着植物受害程度的加深而逐渐升高并达到显著差异( $P < 0.05$ ); 而蚜虫体内只检测到6种, 未能检出甲硫氨酸和色氨酸。蚕豆严重受害后总氨基酸含量较健康植株上升了74.97%, 含量变化达到极显著差异( $P < 0.01$ ), 除了天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和酪氨酸等4种氨基酸未出现显著变化外, 其余16种氨基酸含量均显著升高。和在轻度受害植株上取食的蚜虫相比, 在严重受害植株上取食的蚜虫体内总氨基酸含量上升了25.57%, 含量变化达到了极显著差异( $P < 0.01$ ); 检测到的16种氨基酸中, 只有天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、丝氨酸和鸟氨酸的含量变化未出现显著差异。【结论】豌豆蚜的胁迫诱导了蚕豆植株的一系列应激反应, 导致游离氨基酸含量显著升高, 在其上取食的豌豆蚜体内总氨基酸含量随着寄主氨基酸含量的升高而升高, 但其变化幅度远小于植物的相关氨基酸变化, 这可能与豌豆蚜通过自身代谢和共生菌的调节作用在一定程度上能够控制自身的营养结构有关。

**关键词:** 豌豆蚜; 蚕豆; 韧皮部氨基酸; 必需氨基酸; 反相高效液相色谱法

中图分类号: S43 文献标识码: A 文章编号: 1001-4330(2014)07-1284-08

### Impact of Free Amino Acid Composition of Plant Phloem Sap and Pea Aphid Itself When It Takes Food

ZHU Yu-yong<sup>1,2</sup>, CHEN Li<sup>2</sup>, WANG Jun-gang<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:**【Objective】This study is to determine the impact of aphid feeding on the phloem amino acid composition of broad bean and survivorship of pea aphid.【Method】The amino acids were analyzed by RP-HPLC method. Orthophthalaldehyde (OPA) and 9-formic acid methyl ester of fluorene chlorine (FMOC) were used for online derivatization.【Result】There were 20 amino acids detected from phloem sap of broad bean plant, and 16 amino acids detected from aphid haemolymph. Asparagine was the most abundant amino

收稿日期: 2014-01-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114105)

作者简介: 朱玉永(1988-), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, (E-mail) zhuyuyong2007@126.com

通讯作者: 王俊刚(1970-), 男, 甘肃天水人, 副教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为植物保护, (E-mail) junggawang98@sina.com

acid in both broad bean plant and aphid. All the 8 essential amino acids (EAA) were detected from broad bean phloem sap whereas all essential amino acids but methionine and tryptophan were detected from aphid. The total EEA in broad bean phloem increased significantly with the increase of aphid feeding. In contrast, there was no significant difference in the total EEA in aphids on low - degree damaged plant and seriously damaged plant. The total amino acid (TAA) of seriously damaged plant was 74.97% more than that of healthy plant, and the concentrations of all the amino acids increased significantly except Aspartic acid, Glutamic acid, Asparagine Monohydrate and Tyrosine. The TAA in aphids on seriously damaged plant was only 25.57% more than that in aphids on low - degree damaged plant, likely due to significant difference in Aspartic acid, Asparagine Monohydrate, Histidine and Ornithine. Furthermore, the differences in TAA in broad bean plant (healthy plant versus aphid - infested plant) and in aphids (on low - degree damaged plant versus on seriously damaged plant) were statistically significant. 【Conclusion】Pea aphid feeding induced significant reactions from plant that led to increase of amino acids in broad bean plant, and in aphid. However, the change in aphid was much less than that in plant, suggesting that pea aphid can balance its nutrients for survival possibly by the aid of metabolism and symbiotic bacteria.

**Key words:** pea aphid; broad bean; phloem amino acid; essential amino acid; RP - HPLC

## 0 引言

【研究意义】豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)属半翅目(Hemiptera)蚜科(Aphididae),世界各地均有分布,是豌豆(*Pisum sativum* L.)、蚕豆(*Vicia faba* L.)、苜蓿(*Medicago sativa* L.)等作物上的重要害虫。蚜虫通过其口针刺入植物韧皮部吸食汁液、破坏组织、利用唾液毒害植物等,而且能够传播多种植物病毒。蚜虫将口针刺入植物韧皮部取食植物汁液,同时分泌唾液破坏植物组织、阻止植物的伤口自愈、妨碍植物的正常生长等<sup>[1]</sup>,而且蚜虫口针的不断试探性刺吸能够传播植物病毒。当蚜虫将口针刺入植物组织时,会诱导植物的各种反应,如通过改变自身的物质进行防御反应,同时蚜虫也需要通过自身的调节作用来适应植物的各种反应从而能够持续地获得食物。游离氨基酸是蚜虫生长发育所必需氮素的唯一来源,并以氮素为基础合成自身所需要的各种物质<sup>[2-3]</sup>,因此,游离氨基酸是蚜虫与植物之间相互联系的纽带,分析蚜虫取食过程中游离氨基酸的变化对研究蚜虫取食与植物防御之间的平衡关系以及蚜虫如何适应寄主营养和环境的变化有重要意义。【前人研究进展】RP - HPLC(反相 - 高效液相色谱)法研究植物游离氨基酸目前已经被广泛使用,该方法在测氨基酸方面十分成熟,具有灵敏度高,检测速度快等优点<sup>[4]</sup>。植物韧皮部氨基酸的提取多采用 EDTA 溶液浸提收集<sup>[5-7]</sup>。蚜虫氨基酸采用 10% 乙酸提取<sup>[8]</sup>。【本研究切入点】蚜虫体内氨基酸很少有人研究,其与植物之间的相互关系也值得深入探讨。同时,以游离氨基酸作为蚜虫寄主的营养状况的指标,通过研究氨基酸在植物体内的变化情况,可以间接的反映寄主食物质量与蚜虫生长发育之间的关系。【拟解决的关键问题】以氨基酸含量的变化为指标,研究蚜虫取食对蚕豆韧皮部氨基酸含量的影响,及植物氨基酸改变对蚜虫体内氨基酸含量和生长发育的影响,为蚜虫的生长发育和寄主之间的互作关系研究提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 豌豆蚜

豌豆蚜饲养在养虫笼(25 cm × 25 cm × 30 cm)中的蚕豆幼苗上,养虫笼放置于人工气候箱中 [(22 ± 1) °C, (75 ± 5) % RH, L: D = 16: 8 h], 定期更换幼苗,所有试验均在 5 月到 8 月完成。

#### 1.1.2 蚕豆籽

蚕豆种子(临蚕 5 号,下同)购自于甘肃农业科学院,种子单粒种植在 10 cm × 10 cm 的方形塑料盆

中,基质由 2 份营养土(北京中蔬大森林花卉市场)和 1 份黄土混合而成。待幼苗长到三叶期时开始使用。

### 1.1.3 氨基酸样品

门冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)、鸟氨酸(Orn)等标准氨基酸样品均购于 Amresco 公司。

### 1.1.4 试剂

色谱纯级乙腈、甲醇购于北京百灵威科技有限公司;十二水合磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、硼酸( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )、浓磷酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )、浓盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)等均为分析纯级,购于北京化工厂;邻苯二甲醛(OPA),氯甲酸-9-苄基甲酯(FMOC),3-巯基丙酸(3-MPA)等衍生化试剂来自于 Sigma,水为超纯水。

### 1.1.5 仪器

美国 Agilent Technologies 公司 Agilent 1110 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器(DAD)和荧光检测器(FLD)。梅特勒·托利多 pH 计,OHAUS 万分之一天平,Millipore 超纯水机,真空冷冻干燥机。

## 1.2 方法

### 1.2.1 氨基酸标准样品的制备

称取各种氨基酸 20 mg,分别溶解到 20 mL 0.1 M 的盐酸溶液中,制成相应氨基酸标准样。分别取 20 种氨基酸标准样品 10  $\mu\text{L}$  到 2 mL 的样品瓶,加入 800  $\mu\text{L}$  0.1 M 的盐酸溶液,涡旋震荡 1 min,制成氨基酸混合标准样品备用。

### 1.2.2 样品的制备

#### 1.2.2.1 蚕豆韧皮部氨基酸的提取

参照 King 等<sup>[6]</sup>(1974)的方法,采用 5 mmol/mL 的 EDTA (pH 7.0)溶液提取蚕豆幼苗韧皮部氨基酸。选用盆栽长势均匀的三叶期蚕豆幼苗(高度在 25 ~ 30 cm),茎顶端 10 cm 处用锋利的刀片迅速将茎切断,用超纯水清洗横切面,插入盛有 0.5 mL EDTA 溶液的 PE 管,将管口用脱脂棉和封口膜(Parafilm "M")围绕蚕豆植株茎干密封。放置于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、90% RH 完全黑暗的人工气候箱中,90 min 后将植物组织取出,提取液放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待测。

上机测试前将收集到的氨基酸样品放入冷冻干燥机,-20  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥,再用 50  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L HCL 溶液复溶涡旋震荡 1 min,18 000 g、-4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 10 min,取 40  $\mu\text{L}$  上清液转入 150  $\mu\text{L}$  的内插管中上机测试。

#### 1.2.2.2 蚜虫体内游离氨基酸的提取

随机选取 10 头同龄期成蚜,称量后放入 1.5 mL 的 PE 管,加入 50  $\mu\text{L}$  5% 的醋酸溶液捣碎,再加入 950  $\mu\text{L}$  5% 的醋酸溶液涡旋震荡 1 min,静置 30 min 后在 18 000 g、-4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 10 min,取上清液并用 0.22  $\mu\text{m}$  水相针式过滤器过滤,上机测试。

### 1.2.3 测定项目

#### 1.2.3.1 韧皮部游离氨基酸

试验中接种蚜虫均为 10 日龄无翅成蚜。选用 30 株长势相同的健康三叶期蚕豆幼苗,其中 10 株不接蚜虫为未感染蚜虫植株,为对照植株;另 10 株幼苗上每株只接 10 头 10 日龄成蚜,并每天扫除新出生若蚜,每天观察其生长状态,发现表观上与健康植株无差异,此处理植株作为轻度受害植株;剩余 10 株每株接种 50 头 10 日龄成蚜任其自由生长繁殖,一周后观察发现此处理植株上蚜虫密布,植株出现轻微萎焉并且有蚜虫开始逃离植株,此处理作为严重受害植株;于此时参照 1.2.2.1 方法对各处理植株进行韧皮部氨基酸提取。以上各处理蚕豆植株均放置于人工气候箱(22  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ 、75% RH,L:D = 16:8 h)

中,每天观察植物生长情况,并定期浇水。

#### 1.2.3.2 蚜虫体内游离氨基酸

分别收集 1.2.3.1 中严重受害植株和轻度受害植株上的蚜虫,每 10 头为一组,称量体重后参照文中 1.2.2.2 的方法进行虫体游离氨基酸提取。每处理重复 10 次,各 100 头蚜虫。

#### 1.2.4 色谱条件

色谱柱:Aglient Zorbax Eclipse - AAA (4.6 × 150 mm, 3.5 μm)柱;流动相 A: 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液, pH 7.8;流动相 B: 甲醇: 乙腈: 水 = 45: 45: 10 (V: V: V);流动相流速: 1 ml/min, 柱温箱为 30 °C, DAD 检测波长 338 nm 和 262 nm, 荧光检测器激发波长 340 nm, 发射波长 450 nm。自动进样器进样程序如下:从瓶 1 中吸取 2.5 μL (硼酸缓冲液);从样品瓶中吸取 0.5 μL 样品溶液,在空气中混合 3 μL, 最大速度,2 次;等待 0.5 min;从瓶 2 吸取 0 μL 去离子水(清洗针头);从瓶 3 中吸取 0.5 μL 衍生化试剂(OPA),在空气中混合 3 μL,最大速度,6 次;从瓶 2 吸取 0 μL 去离子水(清洗针头);从瓶 4 中吸取 0.5 μL 衍生化试剂(FMOC),在空气中混合 4 μL,最大速度,6 次;从瓶 5 中吸 32 μL 去离子水;在空气中混合 18 μL,最大速度,2 次;进样。列出梯度洗脱程序。表 1

表 1 流动相梯度条件  
Table 1 Gradient system of mobile phase

| Time/min | A% | B%  | Flow rate/mL/min |
|----------|----|-----|------------------|
| 0        | 98 | 2   | 1                |
| 1        | 98 | 2   | 1                |
| 25       | 43 | 57  | 1                |
| 29       | 0  | 100 | 1                |
| 34       | 0  | 100 | 1                |
| 35       | 98 | 2   | 1                |
| 42       | 98 | 2   | 1                |

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 (SPSS Inc., USA) 等软件进行数据统计与分析,用 Tukey - HSD 多重比较分析法对健康、轻度受害和严重受害蚕豆植株韧皮部氨基酸浓度含量的变化进行比较分析,检验两两之间差异的显著性。轻度受害植株上蚜虫和严重受害植株上蚜虫之间的氨基酸浓度含量的变化比较采用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 健康、轻度受害和严重受害蚕豆韧皮部氨基酸含量比较

从蚕豆植株韧皮部汁液中一共检测到 20 种氨基酸。严重受害蚕豆韧皮部总氨基酸含量较健康蚕豆上升了 1.75 倍,达到了极显著性差异水平 ( $P < 0.01$ );而轻度受害植株的总氨基酸含量与健康植株的相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。各种氨基酸含量出现不同的变化,门冬酰胺在蚕豆植株中含量最高,在健康、轻度受害、严重受害蚕豆植株中分别占总氨基酸含量的 61.48%、47.58%、42.54%,表明其含量随着植物受害程度的加深而降低。在检测到的 20 种氨基酸中,严重受害蚕豆植株与健康植株相比,天冬氨酸、谷氨酸、门冬酰胺、酪氨酸、半胱氨酸含量变化差异不显著 ( $P > 0.05$ );其余的 15 种氨基酸在  $P < 0.05$  水平均有显著差异。大多数氨基酸在植物受到蚜虫刺吸胁迫后均表现出不同程度的升高,其中以谷氨酰胺的变化最为显著,严重受害植株中的含量是健康植株的 8.39 倍;甘氨酸、苏氨酸、组氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸和赖氨酸等的含量变化在 3~7 倍范围内;其余 10 种氨基酸含量变化均在 3 倍以内;8 种必需氨基酸的含量由健康植株中的 11.52% 上升到了严重受害植株中的 20.29%。轻度受害蚕豆植株与健康植株相比,天冬氨酸、谷氨酸、门冬酰胺、酪氨酸、缬氨酸、亮氨酸和

鸟氨酸等氨基酸的含量均有所下降;只有谷氨酸、半胱氨酸和苯丙氨酸的含量变化较大,在3~5.49倍;其余17种氨基酸含量变化均在3倍以内;8种必需氨基酸的含量略高于健康植株,为16.22%。由此可以看出,植物受到蚜虫危害后总氨基酸的含量升高,总必需氨基酸含量与总氨基酸含量比例升高。表2

表2 健康、轻度受害和严重受害蚕豆植株韧皮部氨基酸含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $n=5$ )

Table 2 The concentrations of amino acids from healthy, slightly damaged and seriously damaged broad bean plants ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $n=5$ )

| 氨基酸<br>Amino acid               | 保留时间<br>Retention time<br>(min) | 健康植株<br>Healthy plant          | 轻度受害植株<br>Slightly damaged plant | 严重受害植株<br>Seriously damaged plant |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 天冬氨酸 Asp                        | 3.336                           | 1.08 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>  | 0.73 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>     | 1.33 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>      |
| 谷氨酸 Glu                         | 4.840                           | 1.46 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>   | 0.62 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>     | 1.34 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>      |
| 门冬酰胺 Asn                        | 8.698                           | 39.72 $\pm$ 3.30 <sup>ab</sup> | 29.48 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>    | 48.09 $\pm$ 3.72 <sup>a</sup>     |
| 谷氨酰胺 Gln                        | 9.967                           | 1.52 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>   | 4.58 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>     | 12.80 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>     |
| 甘氨酸 + 苏氨酸<br>Gly + Thr $\Delta$ | 10.284                          | 0.80 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>   | 1.10 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>     | 3.23 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>      |
| 组氨酸 His                         | 10.862                          | 0.92 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>   | 1.72 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>     | 2.94 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>      |
| 丙氨酸 Ala                         | 12.325                          | 0.37 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>   | 0.56 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>    | 0.71 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>      |
| 精氨酸 Arg                         | 12.489                          | 0.36 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>   | 0.80 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>     | 0.95 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>      |
| 丝氨酸 Ser                         | 13.423                          | 5.13 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>   | 6.71 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>     | 13.20 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>     |
| 酪氨酸 Tyr                         | 15.231                          | 6.00 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>   | 5.52 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>     | 6.45 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>      |
| 半胱氨酸 Cys                        | 15.684                          | 0.14 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>   | 0.78 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>     | 0.55 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>     |
| 缬氨酸 Val $\Delta$                | 16.739                          | 1.65 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>   | 1.10 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>     | 5.59 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>      |
| 甲硫氨酸 Met $\Delta$               | 17.495                          | 0.21 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>   | 0.45 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>     | 0.47 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>      |
| 异亮氨酸 Ile $\Delta$               | 19.139                          | 0.78 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>   | 0.66 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>     | 1.11 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>      |
| 亮氨酸 Leu $\Delta$                | 19.424                          | 0.46 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   | 0.50 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>     | 1.58 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>      |
| 色氨酸 Trp $\Delta$                | 19.573                          | 2.79 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>   | 3.80 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>     | 6.06 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>      |
| 苯丙氨酸 Phe $\Delta$               | 19.768                          | 0.25 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>   | 0.92 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>     | 1.69 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>      |
| 鸟氨酸 Orn                         | 20.147                          | 0.46 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>   | 0.42 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>     | 1.76 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>      |
| 赖氨酸 Lys $\Delta$                | 20.318                          | 0.51 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>   | 1.52 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>     | 3.20 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>      |
| 必需氨基酸 EAA                       | -                               | 7.45 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>   | 10.05 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>    | 22.93 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>     |
| 总氨基酸 TAA                        | -                               | 64.61 $\pm$ 3.44 <sup>b</sup>  | 61.96 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>    | 113.05 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>    |

注:表中 $\Delta$ 表示必需氨基酸,数据为平均值  $\pm$  标准误,每行不同小写字母表示同一时间同种氨基酸含量变化差异显著(Tukey-HSD检验,  $P < 0.05$ )

Note:  $\Delta$ : essential amino acid. Data are mean  $\pm$  SE, and means with different letters in the same row are significantly different at the 0.05 level by Tukey-HSD test

## 2.2 豌豆蚜体内游离氨基酸的变化

豌豆蚜体内共有16种氨基酸被检测到,丝氨酸、半胱氨酸以及必需氨基酸中的甲硫氨酸和色氨酸在严重受害植株上的和轻度受害植株上的蚜虫体内均未检测到。总氨基酸含量随着蚕豆韧皮部氨基酸含量的上升而升高,严重受害植株上蚜虫总氨基酸含量为轻度受害植株上蚜虫的1.26倍,含量变化差异达到极显著( $P < 0.01$ ),但其变化幅度小于植物韧皮部的变化幅度(1.75倍)。在检测到的16种氨基酸中,门冬酰胺占总氨基酸比例最高,这与蚕豆韧皮部氨基酸含量结构相似。和轻度受害植株上的蚜虫体内氨基酸相比,严重受害植株上的蚜虫氨基酸中除了谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、精氨酸和亮氨酸含量有所下降,其余10种氨基酸的含量均为上升;门冬氨酸、组氨酸、酪氨酸和赖氨酸的含量差异均达到极显著水平( $P < 0.01$ ),天冬酰胺的含量变化差异达到显著水平( $P < 0.05$ ),其余10种氨基酸的含量差异不显著( $P > 0.05$ )。严重受害植株上的和轻度受害植株上的蚜虫体内必需氨基酸占总氨基酸的比率均在15%左右,两者间无显著差异,这与蚕豆韧皮部氨基酸的变化不同,并没有随着植物韧皮部必需氨基酸含量的升高而升高。各种氨基酸的含量变化均在2.5倍以内,这与蚕豆植株韧皮部氨基酸的变化明显不同。表3

表 3 蚜虫体内游离氨基酸含量的变化 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) ( $n = 5$ )

Table 3 The concentrations of amino acids in aphid

| 氨基酸<br>Amino acid            | 保留时间<br>retention time<br>(min) | 轻度受害植株上的蚜虫<br>Aphids on slightly damaged plant | 严重受害植株上的蚜虫<br>Aphids on seriously damaged plant |
|------------------------------|---------------------------------|--|---|
| 门冬氨酸 Asp                     | 3.336                           | 0.49 ± 0.01                                    | 0.56 ± 0.02 **                                  |
| 谷氨酸 Glu                      | 4.840                           | 1.25 ± 0.05                                    | 1.12 ± 0.05                                     |
| 天冬酰胺 Asn                     | 8.698                           | 3.62 ± 0.09                                    | 5.35 ± 0.70 *                                   |
| 谷氨酰胺 Gln                     | 9.967                           | 2.40 ± 0.12                                    | 2.25 ± 0.11                                     |
| 甘氨酸 + 苏氨酸 Gly + Thr $\Delta$ | 10.284                          | 0.29 ± 0.01                                    | 0.30 ± 0.01                                     |
| 组氨酸 His                      | 10.862                          | 0.22 ± 0.01                                    | 0.50 ± 0.07 **                                  |
| 丙氨酸 + 精氨酸 Ala + Arg          | 12.325                          | 0.67 ± 0.02                                    | 0.59 ± 0.04                                     |
| 丝氨酸 Ser                      | 13.423                          | ND   | ND  |
| 酪氨酸 Tyr                      | 15.231                          | 0.60 ± 0.03                                    | 1.39 ± 0.12 **                                  |
| 半胱氨酸 Cys                     | 15.684                          | ND   | ND  |
| 缬氨酸 Val $\Delta$             | 16.739                          | 0.69 ± 0.05                                    | 0.78 ± 0.06                                     |
| 甲硫氨酸 Met $\Delta$            | 17.495                          | ND   | ND  |
| 异亮氨酸 Ile $\Delta$            | 19.139                          | 0.24 ± 0.01                                    | 0.29 ± 0.04                                     |
| 亮氨酸 Leu $\Delta$             | 19.424                          | 0.14 ± 0.01                                    | 0.12 ± 0.01                                     |
| 色氨酸 Trp $\Delta$             | 19.573                          | ND   | ND  |
| 苯丙氨酸 Phe $\Delta$            | 19.768                          | 0.20 ± 0.02                                    | 0.25 ± 0.01                                     |
| 鸟氨酸 Orn                      | 20.147                          | 0.20 ± 0.01                                    | 0.21 ± 0.02                                     |
| 赖氨酸 Lys $\Delta$             | 20.318                          | 0.26 ± 0.01                                    | 0.43 ± 0.04 **                                  |
| 必需氨基酸 EAA                    | -                               | 1.82 ± 0.11                                    | 2.17 ± 0.15                                     |
| 总氨基酸 TAA                     | -                               | 11.26 ± 0.28                                   | 14.14 ± 0.69 **                                 |

注:表中 $\Delta$ 表示必需氨基酸,ND表示未检测到,\*表示差异显著( $P < 0.05$ ,t检验),\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ ,t检验),数据为平均值 $\pm$ 标准误

Note:  $\Delta$ : essential amino acid. ND: not detected. \*: significant difference ( $P < 0.05$ , t-test), \*\*: Extremely significant difference ( $P < 0.01$ , t-test), Data are mean  $\pm$  SE

### 2.3 豌豆蚜的生长发育状况

称量 1.2.3.2 中蚜虫后发现,生长在严重受害植株上的蚜虫平均体重为( $1.70 \pm 0.03$ ) mg,轻度受害植株上蚜虫的平均体重为( $2.17 \pm 0.02$ ) mg,在严重受害植株上生长的蚜虫体重比在轻度受害植株上的蚜虫下降了 21.80%,体重之间变化差异达到了极显著水平( $P < 0.01$ );调查不同受害程度植株上成蚜的后代翅型分化情况发现,轻度受害植株上收集到的蚜虫没有有翅蚜后代,而严重受害植株上收集到的蚜虫有翅蚜后代比率约为 45%~60%,大量有翅蚜的出现表明蚜虫的生存环境很不利;此时有大量的蚜虫从严重受害植株上逃逸,并且体色较轻度受害植株上蚜虫明显发暗;而轻度受害植株上蚜虫始终稳定取食,体色为淡绿色。以上结果表明此时严重受害植株的条件已经不适合蚜虫的生长发育,其营养情况无法满足蚜虫的需要,另外,蚜虫为害植物会诱导植物的防御反应,植物产生有防御作用的次生代谢产物或防御蛋白<sup>[9]</sup>(Maleck and Dietrid, 1999)也会影响昆虫的发育,这些两方面的共同作用迫使蚜虫逃离恶劣生存环境而寻找新的寄主。

## 3 讨论

严重受害的蚕豆植株韧皮部氨基酸含量与健康植株和轻度受害植株相比显著升高,而且在蚕豆植株上取食的豌豆蚜体内氨基酸含量随着蚕豆韧皮部总氨基酸含量的升高而上升,但豌豆蚜体内氨基酸含量变动幅度为 25.57%,远小于植物韧皮部氨基酸含量 74.97% 的变化,而且蚜虫体内的必需氨基酸含量始终维持在同一水平,未出现显著的改变。这说明蚜虫一方面通过改变自身氨基酸含量来适应生存环境的变化<sup>[8]</sup>,另一方面又通过自身调节作用来维持自身取食的营养结构平衡,如蜜露排泄<sup>[10]</sup>,自身共生菌的转化作用<sup>[11-12]</sup>等。

蚜虫在取食之前试探性的将口针刺入植物组织,同时分泌出含有大量消化酶类的胶状唾液和水状

唾液,这些酶能够阻止植株上被蚜虫刺穿的伤口愈合,因此蚜虫才能持续不断地取食植物汁液<sup>[13]</sup>,以保证自身氨基酸等营养物质的摄入量。另一方面蚜虫分泌的这些酶能够引发植物一系列的应激反应<sup>[14]</sup>,包括直接防御反应和间接防御反应,其中的直接防御反应能够通过改变自身的营养成分结构来阻止昆虫获得营养<sup>[15]</sup>。蚜虫唾液成分能够在不同的寄主以及环境条件下发生改变<sup>[16]</sup>,研究表明,蚜虫唾液中含有一定量能够降解植物叶片以及植物组织中酶类,从而使植物体液中的氨基酸含量升高<sup>[17]</sup>,但植物中的氨基酸含量相对蚜虫的需求来说依然很低。因此,蚜虫一方面大量的取食汁液来获取更多的营养物质,另一方面,蚜虫通过体内共生菌(*Buchnera*)的转化作用也能提高进入自身消化道的游离氨基酸含量。目前已证实 *Buchnera* 的主要功能是为宿主蚜虫提供多种必需氨基酸<sup>[18-20]</sup>。*Buchnera* 具有合成必需氨基酸的基因和功能<sup>[21-23]</sup>。蚜虫与 *Buchnera* 的这种共生的模式大大地提高了蚜虫对外源氨基酸的利用率,使其能够适应寄主营养状况的改变。蚜虫自身所利用必需氨基酸的 90% 由自身体内的共生菌提供,据文献记载蚕豆韧皮部汁液最高只含有 21.6% 的必需氨基酸<sup>[24]</sup>,研究中严重受害植株必需氨基酸的含量达到了 20.29%,因此,单纯靠外界氨基酸蚜虫无法正常的进行生长发育,必须通过大量的吸食汁液和体内共生菌的转化作用才得到足够的营养成分。

蚕豆在受到严重伤害后,韧皮部游离氨基酸的含量显著升高,这对蚜虫从植物中摄取充足的营养成分有利,但是在长时间以及大量的蚜虫取食时,一方面植物自身生长的营养物质缺失,另一方面蚜虫刺吸危害越来越重,最终导致植物无法正常的生长发育,防御系统崩溃。同时蚜虫取食韧皮部汁液的时候从口针中分泌出的酶类,对植物也有毒害作用<sup>[25]</sup>,这些酶类的积累也会对植物造成不可逆转的伤害。以上这些最终导致植物严重受害、萎焉、枯死等。蚜虫生长发育所必需的食物和水是通过吸食植物韧皮部汁液而来<sup>[26]</sup>,当植物严重受害后营养系统和代谢系统崩溃,即便是通过体内共生菌以及蚜虫自身调节也无法平衡取食营养结构,从而导致蚜虫无法正常的生长发育,出现营养不良症状,身体表现为干瘪,体色变暗,体重下降,蜜露的排泄减少等,并最终迫使蚜虫不得不转移寄主生存。

#### 4 结论

蚕豆在受到豌豆蚜的刺吸胁迫后体内的游离总氨基酸含量升高,对蚜虫来说食物变的丰富,有利于蚜虫的生长。蚜虫体内的氨基酸含量随着寄主氨基酸含量的升高而出现小幅度上升,在一定程度上在通过其体内共生菌的帮助以及自身代谢调节仍能保持身体营养结构的平衡,并不会影响蚜虫的正常生长发育,说明了蚜虫对寄主营养的改变具有适应性。但是植物受到持续的伤害并慢慢萎焉,整个代谢系统崩溃,体内营养结构剧烈变动,在其上取食的蚜虫无法维持自身食物的营养平衡并获取足够的营养,导致蚜虫生长发育受阻,体重下降,体色变暗以及大量有翅蚜的出现,而大量有翅蚜的出现是蚜虫逃离恶劣环境的最明显信号。研究为蚜虫与寄主食物质量之间的互作关系提供理论基础。

#### 参考文献 (References)

- [1] Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (1994). *Aphids on the world's trees: an identification and information guide*. Cab international.
- [2] Karley, A. J., Douglas, A. E., & Parker, W. E. (2002). Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *Journal of Experimental Biology*, 205(19), 3,009 - 3,018.
- [3] Mattson, W. J. (1980). Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual review of ecology and systematics*; 119 - 161.
- [4] 刘荣森, 杨虹琦, 黄郁维. 植物中游离氨基酸的提取、纯化及分析方法[J]. 河南科技大学学报, 2007, 28(3): 76.  
LIU Rong - sen, YANG Hong - qi, HUANG Yu - wei. (2007). Extraction, Sublimation and Analysis on Free Amino Acids in Plants [J]. *Journal of Henan University of Science & Technology*, 28(3): 76. (in Chinese)
- [5] Douglas, A. E. (1993). The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecological Entomology*, 18(1): 31 - 38.
- [6] King, R. W., & Zeevaert, J. A. D. (1974). Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology*, 53(1): 96 - 103.

- [7] 葛体达, 姜武, 宋世威, 等. 无机氮和氨基酸态氮处理对番茄幼苗木质部和韧皮部中矿质养分的影响[J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 347-354.  
GE Ti-da, JIANG Wu, SONG Shi-wei, et al. (2009). Influence of inorganic and amino acid nitrogen on mineral nutrient contents in xylem and phloem sap of different tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 36(3): 347-354. (in Chinese)
- [8] Guo, H., Sun, Y., Li, Y., Tong, B., Harris, M., Zhu - Salzman, K., & Ge, F. (2013). Pea aphid promotes amino acid metabolism both in *Medicago truncatula* and bacteriocytes to favor aphid population growth under elevated CO<sub>2</sub>. *Global change biology*, 19(10): 3, 210-3, 223.
- [9] Maleck, K., & Dietrich, R. A. (1999). Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?. *Trends in plant science*, 4(6): 215-219.
- [10] Leroy, P. D., Wathelet, B., Sabri, A., Francis, F., Verheggen, F. J., Capella, Q., ... & Haubruge, E. (2011). Aphid-host plant interactions: does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(3): 193-199.
- [11] Febvay, G., Rahbé, Y., Rynkiewicz, M., Guillaud, J., & Bonnot, G. (1999). Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, reared on different diets. *Journal of Experimental Biology*, 202(19): 2, 639-2, 652.
- [12] Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual review of entomology*, 43(1): 17-37.
- [13] Tjallingii, W. F. (2006). Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 739-745.
- [14] Miles, P. W. (1999). Aphid saliva. *Biological Reviews*, 74(1): 41-85.
- [15] 秦秋菊, 高希武. 昆虫取食诱导的植物防御反应[J]. 昆虫学报, 2005, 48(1): 125-134.  
QIN Qiu-ju, GAO Xi-wu. (2005). Plant defense responses induced by insect herbivore [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 48(1): 125-134. (in Chinese)
- [16] 殷海娣, 黄翠虹, 薛莹, 等. 昆虫唾液成分在昆虫与植物关系中的作用[J]. 昆虫学报, 2006, 49(5): 843-849.  
YIN Hai-di, HUANG Chui-hong, XUE Kun, et al. (2006). Roles of insect salivary components in insect-plant interactions [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 843-849. (in Chinese)
- [17] Dorschner, K. W., Ryan, J. D., Johnson, R. C., & Eikenbary, R. D. (1987). Modification of host nitrogen levels by the greenbug (Homoptera: Aphididae): its role in resistance of winter wheat to aphids. *Environmental Entomology*, 16(4): 1, 007-1, 011.
- [18] Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhbachsh, D., Moran, N. A., & Clark, M. A. (1995). Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1): 55-94.
- [19] Douglas, A. E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 747-754.
- [20] Birkle, L. M., Minto, L. B., & Douglas, A. E. (2002). Relating genotype and phenotype for tryptophan synthesis in an aphid-bacterial symbiosis. *Physiological entomology*, 27(4): 302-306.
- [21] Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800): 81-86.
- [22] Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Wernegreen, J. J., ... & Andersson, S. G. (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296(5577): 2, 376-2, 379.
- [23] van Ham, R. C., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., ... & Moya, A. (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2): 581-586.
- [24] Sandström, J., & Pettersson, J. (1994). Amino acid composition of phloem sap and the relation to intraspecific variation in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) performance. *Journal of Insect Physiology*, 40(11): 947-955.
- [25] Carolan, J. C., Fitzroy, C. I., Ashton, P. D., Douglas, A. E., & Wilkinson, T. L. (2009). The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics*, 9(9): 2, 457-2, 467.
- [26] Saheed, S. A., Botha, C. E. J., Liu, L., & Jonsson, L. (2007). Comparison of structural damage caused by Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) and Bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) in a susceptible barley cultivar, *Hordeum vulgare* cv. Clipper. *Physiologia plantarum*, 129(2): 429-435.