

分类号: S435

单位代码: 10335

密 级: 无

学 号: 21616145



Y3613139

浙江大学

硕士学位论文



丽蝇蛹集金小蜂寄主定位及气味结合蛋白分析

The analysis on host localization and odorant binding

proteins of *Nasonia vitripennis*

申请人姓名: 金 妙

指导教师: 黄 佳 教授

叶恭银 教授

专业名称: 农业昆虫与害虫防治

研究方向: 昆虫行为学

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二零一九年六月

分类号: S435

单位代码: 10335

密 级: 无

学 号: 21616145

浙江大学



硕士学位论文



丽蝇蛹集金小蜂寄主定位及气味结合蛋白分析

The analysis on host localization and odorant binding

proteins of *Nasonia vitripennis*

申请人姓名: 金 妙

指导教师: 黄 佳 教授

叶恭银 教授

专业名称: 农业昆虫与害虫防治

研究方向: 昆虫行为学

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期 二零一九年六月

丽蝇蛹集金小蜂寄主定位及气味结合蛋白分析



论文作者签名: 金世

指导教师签名: 韩召军

论文评阅人 1: 双向隐名评阅

评阅人 2: 双向隐名评阅

评阅人 3: 双向隐名评阅

答辩委员会主席: 韩召军 教授 南京农业大学

委员 1: 陈学新 教授 浙江大学

委员 2: 俞晓平 教授 中国计量大学

委员 3: 傅强 教授 中国水稻研究所

委员 4: 李飞 教授 浙江大学

答辩日期: 二零一九年六月五号

**The analysis on host localization and
odorant binding proteins of *Nasonia vitripennis***



Author's signature: Miao Jin

Supervisor's signature: Jin Han

Thesis reviewer 1: Anonymous

Thesis reviewer 2: Anonymous

Thesis reviewer 3: Anonymous

Chair: Prof. Han Zhaojun, Nanjing Agricultural
University

Committeeman 1: Prof. Chen Xuexin, Zhejiang University

Committeeman 2: Prof. Yu Xiaoping, China Jiliang University

Committeeman 3: Prof. Fu Qiang, China National Rice
Research Institute

Committeeman 4: Prof. Li Fei, Zhejiang University

Date of oral defence: 5 June, 2019

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 金妙 签字日期： 2019 年 6 月 19 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名： 金妙
签字日期： 2019 年 6 月 19 日

导师签名： 姜山
签字日期： 2019 年 6 月 19 日

本研究承蒙

国家自然科学基金
重点国际（地区）合作研究项目
(31620103915)

资助

致谢

时光飞逝，我在浙江大学紫金港校区已经度过了七年的求学时光。回想起来，这几年真是漫长而又短暂：犹记得期末考前的挑灯夜读，或是咖啡馆中的彻夜刷题；犹记得第一次参加昆虫实习时的兴奋与新奇；犹记得参加硕士招生面试时的紧张与激动……这些宝贵的经历让我从一名茫然的大一新生成长为即将步入社会的“大人”。一路走来，遇见了太多的良师益友，没有他们的帮助与指导，我也无法顺利完成我的学业。

首先非常感谢我的导师黄佳教授与叶恭银教授。黄老师科研能力强，才思敏捷，在我实验遇到困难时及时指点，提供新思路和新方法，帮我解决疑惑，我能顺利完成预计的实验与最后的论文写作离不开黄老师的指导与帮助。叶老师学识渊博、治学严谨，不仅仅在科研上对我们严格要求，平时生活中更是细心教导，时常与我们讲点做人的道理，树立爱国爱党爱学习的意识。所以虽然叶老师工作繁忙，但是遇到困难总是会向叶老师寻求帮助，他就是实验室里的“大家长”。同时，也很感谢实验室里的姚洪渭老师和方琦老师，他们在学习和生活上给了我很多的指导与帮助。

还要特别感谢昆虫生理生化实验的各位师兄师姐师弟师妹在实验和生活中给与的帮助，感谢滕子文、汪芳、王飞、徐刚、严智超几位博后在实验中的指导；感谢已经毕业的顾桂香、李晶晶、李萌琪、王龙、杨蕾对我的帮助；特别感谢常学飞、党聪、毛芬、王蓓蓓、肖山在实验中给予的帮助与支持；感谢即将一起毕业的梅耀天、刘明明、孙初一几位“战友”；感谢贾文茜、王嘉乐、熊时姣、杨磊、金虹霞、倪旭阳、张佼、杨义、俞凯丽、吴慧子、钟馥骏、洪锐、卢婉君、仇黎明、任朝都、宋吉强、孙琳琳、袁博、周振东，对我生活和科研上的帮助和鼓励。

除此之外，还要感谢浙江大学这个大平台，能让我得到充分的锻炼。感谢本科期间的两位班主任，甘银波老师和时敏老师；感谢曾经教导过我的鲍艳原老师、陈学新老师、将明星老师、刘树生老师、娄永根老师、莫建初老师、张传溪老师、祝增荣老师等，老师们的教诲一直铭记于心。还要感谢浙江大学电镜中心的戎念杭老师在拍摄扫描电镜照片时给予的帮助。

感谢父母亲多年来的关心与爱护，以及对我学业上的理解与支持。感谢朋友

们的陪伴，让我在学习之余拥有快乐的休闲时光。同时，我要感谢我自己，在求学过程中，没有放弃，一直坚持到现在，对自己这七年的学习画上一个圆满的句号。

最后，向百忙之中参与评审论文的各位老师以及参与此次论文答辩的老师表示衷心的感谢。

金妙

2019年6月于浙江大学紫金港校区

摘要

丽蝇蛹集金小蜂是膜翅目的一种特异性外寄生蜂,主要寄生蝇蛹,包括丽蝇、麻蝇、家蝇等多种蝇类,是很好的蝇类生物防治物种,具有良好的发展前景。本文以丽蝇蛹集金小蜂为研究对象,结合行为学的方法探究寄生蜂触角在寄主定位中的作用以及主要的作用部位;利用分子生物学技术探究寄生蜂触角中的气味结合蛋白分布情况,利用 RNA 干扰技术探究气味结合蛋白在寄生蜂寄主定位及选择中的作用。

1. 丽蝇蛹集金小蜂触角在寄主定位中的作用

采用行为学方法,探究丽蝇蛹集金小蜂对麻蝇蛹、家蝇蛹、黑腹果蝇蛹 3 种不同蝇蛹的偏好性。结果表明,丽蝇蛹集金小蜂对麻蝇蛹的寄生概率最高,达到 68%左右;其次是家蝇蛹,达到 52%左右;而对黑腹果蝇蛹的选择性最低,只有 12%左右,且未发生寄生行为,三者差异显著。除此之外分析了寄生蜂定位到麻蝇蛹和家蝇蛹的时间,两者之间没有显著差异。因此,丽蝇蛹集金小蜂对于三种蝇蛹的偏好性为:最喜欢麻蝇蛹,其次是家蝇蛹,最后是黑腹果蝇蛹。

为探究触角在寄主定位中的作用,通过切除寄生蜂全部或部分触角进行实验,观察行为变化情况。结果表明,切除全部触角后寄生蜂找到麻蝇蛹的概率显著降低,但时间上没有显著差异;而只切除触角鞭节部分或者 1/3 鞭节的寄生蜂反而搜寻到麻蝇蛹的概率增大,且搜寻时间减少,两种指标均有显著变化。

2. 丽蝇蛹集金小蜂触角上的气味结合蛋白初探

利用定量 PCR 技术确定了在触角上高表达的 OBPs 基因,选择其中的 OBP1、OBP3、OBP18、OBP26、OBP34、OBP41、OBP43、OBP76、OBP77、OBP83、OBP84、OBP90 这 12 个基因进行 RNA 干扰。选择寄生后 9~10 天的蛹,注射的 dsRNA 浓度为 3500 ng/ μ l,注射剂量为 30~40nl。注射两天后用定量 PCR 检测干扰效率。结果表明只有 OBP26、OBP41 两个基因的干扰效率在 60%以上。在出蜂后观察这两个基因干扰后的寄生蜂,触角形态以及行为学实验均未发现显著变化。根据结果推测 OBPs 基因在 RNA 干扰效率在 60%左右时不会影响表型变化。

关键词:丽蝇蛹集金小蜂,寄生蜂,触角,寄主定位,气味结合蛋白

Abstract

Nasonia vitripennis (Hymenoptera: Pteromalidae) is a specific ectoparasitoid that attacks the pupae of fly species, including blow flies, flesh flies, and house flies. It is considered to be a biological method for flies control with great development prospects. The researches study the influence of antennae of parasitoid on host localization and host selection and try to find the area in antennae that works. The article uses molecular biology techniques to search the distribution of odorant binding proteins (OBPs) in antennae. The study also investigates the function roles of odorant binding proteins in host selection of the parasitoids.

1. Influence of antennae on host localization of *Nasonia vitripennis*

Firstly, behavioral approach is used to study the preference of *Nasonia vitripennis* to three kinds of pupae: flesh fly pupae, housefly pupae and fruit fly pupae. The results show the significant difference: the rate of choosing flesh fly pupae is highest with 68% and housefly pupae are second with 52%, while the rate of choosing fruit fly pupae is lowest with 12%. But the times to find those kinds of pupae have no difference. That means the parasitoids prefer flesh fly pupae than housefly pupae, and dislike the fruit fly pupae as it is not in the host range.

Experiments of cutting the antennae of *Nasonia vitripennis* are conducted to find the functions of antennae in host localization. The results show the rate of finding the pupae is reduced after cutting the whole antennae, while the rate is rising after cutting part of the antennae. There are significant difference in rate and time of finding the host pupae between the experimental and control groups.

2. A preliminary study of odorant binding proteins (OBPs) in antennae of *Nasonia vitripennis*

The real time quantitative PCR technique is used to define those odorant binding proteins (OBPs) that have high expression in the antennae of *Nasonia vitripennis*. Then, 12 genes of OBPs are chose to undertake the RNA interference experiment. The results show only two genes' interference efficiency is higher than 60%, and the

others are lower than 50%. And observing the morphological feature of antennae of adult parasitoids after RNAi, there is no significant difference. The results infer that the efficiency of RNAi around 60% has no impact on these OBPs genes.

Key words: *Nasonia vitripennis*, ectoparasitoid, antenna, host localization, odorant binding proteins

目录

致谢	I
摘要	III
Abstract.....	IV
第一章 文献综述	1
1.1 昆虫寄主定位机制.....	1
1.1.1 化学信息素	1
1.1.2 昆虫的嗅觉感器	5
1.2 昆虫气味结合蛋白研究进展	8
1.2.1 OBPs 特征与分类	9
1.2.2 OBPs 研究现状.....	10
1.3 丽蝇蛹集金小蜂研究概况	11
1.4 本研究的目的和意义	13
第二章 丽蝇蛹集金小蜂触角对寄主定位的影响.....	15
2.1 材料与方法.....	15
2.1.1 供试虫源	15
2.1.2 统计标准	16
2.1.3 丽蝇蛹集金小蜂对不同蝇蛹的偏好性	16
2.1.4 丽蝇蛹集金小蜂触角切除后对蝇蛹定位的影响.....	16
2.1.5 分析方法	17
2.2 结果与分析.....	17
2.2.1 丽蝇蛹集金小蜂对不同蝇蛹的偏好性	17
2.2.2 丽蝇蛹集金小蜂触角切除后对蝇蛹定位的影响.....	19
2.3 小结与讨论.....	21
第三章 丽蝇蛹集金小蜂触角 OBPs 初探	23
3.1 材料与方法.....	23
3.1.1 供试虫源	23
3.1.2 试剂与仪器	23
3.1.3 PCR 产物回收与纯化.....	24
3.1.4 总 RNA 提取	24

3.1.5 cDNA 合成	25
3.1.6 实时荧光定量 PCR	25
3.1.7 dsRNA 的合成与纯化	40
3.1.8 实验方法	40
3.2 结果与分析	41
3.2.1 丽蝇蛹集金小蜂 OBPs 定量结果	41
3.2.2 RNA 干扰效率分析	43
3.2.3 显微镜观察丽蝇蛹集金小蜂表型变化	47
3.2.4 行为学验证 RNA 干扰效率	47
3.3 小结与讨论	49
总结	50
参考文献	51
附录 1	59
附录 2	63
作者简历	75

第一章 文献综述

1.1 昆虫寄主定位机制

随着化学农药大量使用导致环境日渐恶化,越来越多的科研工作者认识到生物防治的重要性。而在其中,寄生性天敌,尤其是寄生蜂,是种类最多、分布最广的一类,是研究和开发的重点。研究寄生蜂寻找寄主的机制有利于理清楚植物—寄主—寄生蜂三者之间的关系,为开展生物防治工作提供理论依据,比如寻找合适的寄生蜂品种、放蜂条件等。

1.1.1 化学信息素

植食性昆虫可以用视觉和嗅觉线索(植物性状、颜色、挥发物等)来定位寄主(Kerr *et al.*, 2017),而寄生蜂寻找寄主的过程,却更为复杂而又漫长的。首先寄生蜂得从遥远的地方发现寄主的生境;然后需要准确地找到寄主,比如找到隐藏的卵(Rosi *et al.*, 2001)、藏在枝干里的幼虫(Wolfing and Rostas, 2009)、寄主的蛹等;之后需要判断寄主是否适合寄生甚至是寄主的性别(Colazza *et al.*, 2007),如相对于寄生蛹丽蝇蛹集金小蜂更偏向于未寄生蛹(张忠等, 2008);最后在寄主身上找到最佳的寄生位置以及寄生数量,丽蝇蛹集金小蜂就主要在蝇蛹的腹部产卵(张忠等, 2008)。这一过程中,有非常多的影响因素,包括内因和外因(Zwiebel and Takken, 2004),如气候条件、寄主质量、病原感染、经验学习(Quilici and Rouse, 2012; Masry *et al.*, 2018)等原因。其中,化学因素是最为重要的影响因子,成为联系植物—植食性昆虫—寄生蜂三级营养关系的纽带(李玉利等, 2009)。

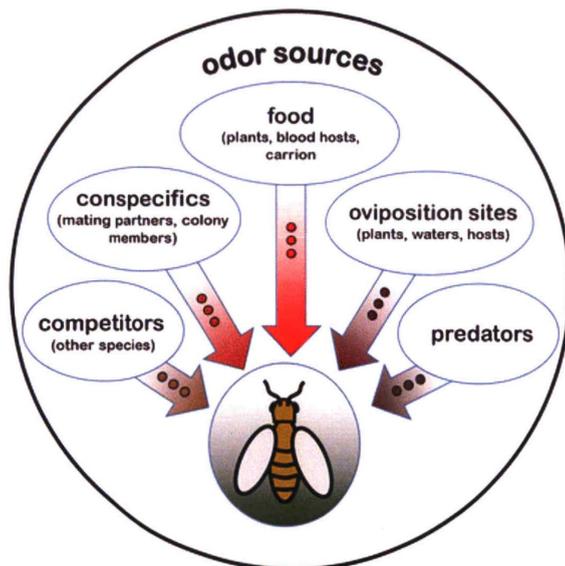


图 1.1 环境中气味分子的作用(Fleischer *et al.*, 2018)

Figure1.1 The role of odor in the environment (Fleischer *et al.*, 2018)

昆虫的气味世界描述。在昆虫所处的自然环境中，会遇到种类多到数不清的化学物质。这些包括了由同种昆虫散发的信息素，以用于种间交流；以及含有竞争者、捕食性天敌、产卵地点、食物来源等信息的化学信息素。昆虫的嗅觉系统能对这些空气中的气味线索做出灵敏的探测以及精确的鉴定。

化学信息素（semiochemical）指的是来源于寄主植物、寄主及其相关的生物或者是两者的混合物，且能引起寄生蜂产生一系列行为反应的化学物质，这些特异或非特异(Steidle and Loon, 2003)、单种或多种混合的化学信息素是寄生蜂寻找寄主的主要线索(许维岸等, 2000; Steidle and Loon, 2003; 韩文素等, 2010)。化学信息素可分为信息素（pheromone）和他感化合物（allelochemicals）(任炳忠等, 2017)。

表 1.1 化学信息素的分类

Table 1.1 Classification of semiochemical

	分类	介绍	代表种类
信 息 素	性信息素 (Sex pheromone)	多由雌性分泌，可干扰昆虫的化学通讯(王安佳等, 2018)。	家蚕: (<i>E,Z</i>)-8,10-十六碳二烯-1-醇(Sakurai <i>et al.</i> , 2014)
	聚集信息素 (aggregation pheromone)	主要由雄性分泌，形式多样化，可召集同种或者近缘种。	云杉八齿小蠹: 马鞭草烯酮(姜勇等, 2002)
	报警信息素 (alarm pheromone)	由昆虫个体分泌，在发现敌害时向同伴报警。	蚜虫: (E) - β -farnesene (EBF)(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
	示踪信息素 (trail pheromone)	社会性昆虫中标明个体活动踪迹的信息素。	蚁类(Holldobler and Wilson, 1977)
	标迹信息素 (mark pheromone)	寄生蜂类昆虫用于标记寄生卵，又称产卵驱避信息素(Rosi <i>et al.</i> , 2001; 迟克强等, 2004)。	沟卵蜂(Rosi <i>et al.</i> , 2001)
	他 感 化	利己素(allomone)	对释放者有利，对接受者不利。
利他素(kairomone)		对释放者不利，对接受者有利。	柳树: 水杨苷 (对于桉木绿叶甲) (黄寿山等, 2000)
互利素(synomone)		对释放者和接受者均有利。	亚洲玉米螟: 反-12-十四碳烯乙酸酯 (赤眼蜂)

合 物			(白树雄等, 2004)
	抗性素(antimone)	对释放者和接受者都不利。	在寄主—病原菌中最为普遍
	副信息(parapheromone)	人工合成的昆虫信息素类似物, 作为信号引导物。	水杨酸甲酯(Cardinale <i>et al.</i> , 2003)

1.1.2 昆虫的嗅觉感器

嗅觉作为昆虫感知外界环境的主要手段之一,在寻找栖息地、食物、配偶以及寄主定位、繁殖、信息交流等各个方面都起着十分重要的作用(Field *et al.*, 2000; Sato and Touhara, 2009; 莫建初等, 2019)。昆虫有着极其灵敏且高度专一的嗅觉感知系统,而这主要通过触角、足和产卵器等器官上的感器(sensilla)以及相关蛋白组成,并完成相关的化学信息素识别等关键步骤。

感器是有昆虫表皮特化形成的具有特殊功能的薄壁构造,表面分布着大量微孔。当触角里的气味受体等接收到外界的化学信号后,将其转化为电信号,进而传送至前脑(Gu *et al.*, 2013)。前脑中含有学习和记忆气体分子的蕈状体(mushroom body)结构,可以对传送来的气味信息进行处理(Pregitzer *et al.*, 2014)。通过对这些化学物质的分析和判断,来感知周边环境并作出正确的行为反应(Leal, 2013; Fleischer *et al.*, 2018)。

这是一个步骤繁多、机理复杂的过程,有多种蛋白参与其中(de Bruyne and Baker, 2008): 气味受体(odorant receptors, ORs)(Hallem *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2010)、离子受体(ionotropic receptors, IRs)(Benton *et al.*, 2009; van Giesen and Garrity, 2017)、气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)(Zhou *et al.*, 2010)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)(Wanner *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2016)、气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)(Rybczynski *et al.*, 1990)、感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)(Rutzler and Zwiebel, 2005)等。

寄生蜂的嗅觉感器种类繁多,主要集中在触角上。寄生蜂成功寻找到寄主,并在特定寄主上寄生,是依靠环境及寄主本身带有的多种多样的化学及物理线索。在这一成功选择的过程中,触角上的感器发挥着极大的作用(Consoli *et al.*, 1999)。寄生蜂触角上感器的类型非常多,且在种与种之间差异较大,与之对应的是具有多种功能(马瑞燕, 2000),主要包括机械感知、重力感知、温度感知、湿度感知、味觉感知,以及最为重要的化学感知,包括普通的化学分子的识别以及性信息素等特定化合物的识别。

表 1.2 昆虫触角感器的类型及功能

Table 1.2 Types and functions of antennal sensilla in insects

名称	形态	功能
毛形感器 (<i>sensilla trichodea</i>)	较长，顶端弯曲且较钝，分布最广泛，数量最多	主要为机械感知和味觉功能，感受性信息素
刺形感器 (<i>sensilla chaetica</i>)	直立于触角表面，明显比其他感器位置高，表面具有纵向沟纹	感知机械刺激
锥形感器 (<i>sensilla basiconca</i>)	较短，表面有丰富的小孔	嗅觉感器，感知气味
Bohm 氏鬃 (<i>Böhm bristles</i>)	形态短小，有基窝，基本垂直于触角表面	感知重力
腔锥形感器 (<i>sensilla coeloconica</i>)	形态似菊花，腔体中心部位有感觉锥	识别普通气味分子，如二氧化碳、湿度变化等(Benton, 2007)
栓锥形感器 (<i>sensilla styloconica</i>)	类似拇指，顶端有小锥状突起	具有味觉和嗅觉功能，能感知湿度(Yan <i>et al.</i> , 2017)
鳞形感器 (<i>sensilla squamiformia</i>)	表面结构域鳞片相似，比鳞片狭长且端部尖细，基部有领状窝	感知机械刺激或化学刺激

名称	形态	功能
耳形感器 (<i>sensilla auricillica</i>)	有耳状凹槽，端部钝圆，表面布满小孔	物理感知，可能具有接受声波的功能
钟形感器 (<i>sensilla campaniformia</i>)	表皮呈半球状，周围有一圈光滑的厚壁边缘， 形似纽扣	感知机械刺激或是温湿度感器
板形感器 (<i>sensilla placodea</i>)	多为椭圆形盘状结构，顺着触角生长在凹陷 的穴中	感知信息素，具嗅觉功能
瓶形感器(<i>sensilla ampullacea</i>)	生长在表皮凹槽内，似长颈瓶状	感知湿度等
坛形感器 (<i>sensillum ampullaceum</i>)	触角表面有较深的坛形凹槽，中间有球状突 起	感知气味、温湿度等
镰刀形感器 (<i>sensillum falcatas</i>)	两面有斜向凹槽，并在感器腹面相接形成一 条纵嵴	机械感知及化学感受(Zhang <i>et al.</i> , 2012)

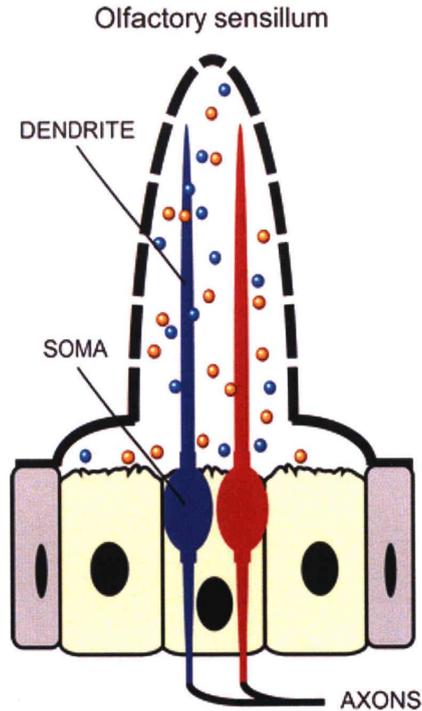


图 1.2 昆虫嗅觉感受器示意图 (Rützler *et al.* 2005)

Figure 1.2 Map of olfactory receptor in insects (Rützler *et al.* 2005)

每个嗅觉感器内包含有 1-4 根嗅觉受体神经元 (olfactory receptor neurons, ORNs), 其神经元树突伸入感器内的淋巴液中。脂溶性的气味分子通过扩散作用从感器上的微孔进入淋巴内, 与其中的气味结合蛋白 (OBPs) 形成水溶性的蛋白复合物, 之后穿越水溶性的淋巴液并与嗅觉受体神经树突上的位点相结合, 激活受体进而产生动作电位, 完成化学信号转化为电信号的过程。

1.2 昆虫气味结合蛋白研究进展

随着高通量测序技术的发展, 快速而全面地找到昆虫中有关化学交流的嗅觉基因成为可能。但是, 如何对这些嗅觉相关蛋白进行分类是一个难题, 比如气味受体 (odorant receptors) 和气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 两种蛋白都是与气体相关 (Yin *et al.*, 2019); OBPs 与化学感受蛋白 (chemosensory protein, CSPs) 都是水溶性蛋白, 含有保守的半胱氨酸残基 (Sun *et al.*, 2016) 等。同时, 气味结合蛋白在昆虫触角及其他身体组织中广泛表达, 明确参与嗅觉感知,

但是外界的化学信息素等刺激是如何被这些蛋白所识别并通过这些蛋白来调节整个生理活动仍然存在疑问(Zhou, 2010; Paula *et al.*, 2018)。通过对 OBPs 的研究, 寻找昆虫定位寄主的机制, 为害虫防治技术提供理论基础。

1.2.1 OBPs 特征与分类

昆虫气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 是最先鉴定的明确参与昆虫嗅觉感知的一类蛋白, 在昆虫的嗅觉器官中大量表达(Fan *et al.*, 2011), 广泛地分布于淋巴液中。可以说, OBPs 是沟通外部环境与气味受体 (ORs) 的桥梁。通过 OBPs 的传输, 气体分子穿过淋巴液到达分布于触角中的神经元树突周围, 并激活 ORs 产生动作电位, 将化学信号转化为电信号(Krieger *et al.*, 1993; Brito *et al.*, 2016)。此外, 有研究表明, OBPs 不仅与嗅觉相关, 而且还具有有味觉功能 (Montell, 2009), 对于昆虫整个感知系统是十分重要的。

OBPs 是一类水溶性蛋白, 分子量较小, 一般由 120-150 个氨基酸组成, 在 N 端有一段 20 个氨基酸组成的信号肽。昆虫 OBPs 最显著的特征是具有 6 个保守的半胱氨酸残基, 并且两两连接 (1-3,2-5,4-6) 形成 3 对相互交叉的二硫键, 最终使得蛋白的三维结构具有很好的稳定性(Pelosi *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2012; Leal, 2013)。OBPs 的外部为亲水性, 可以在淋巴液中自由活动; 而内部为疏水性的腔体结构, 这一特点使得 OBPs 可以在内部结合气体分子并在水溶性的淋巴液中进行运输(Leal, 2013; Zheng *et al.*, 2016)。

根据氨基酸中含有的半胱氨酸残基数和序列特征可以将 OBPs 分为以下几类 (Hekmat-Safe *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003):

- (1) Classic OBPs: 具有经典的结构特征, 6 个半胱氨酸残基;
- (2) Dimer OBPs: 含有两个 6-半胱氨酸;
- (3) Plus-C OBPs: 半胱氨酸多于 2 个, 具有 8 个半胱氨酸和 1 个脯氨酸位点;
- (4) Minus-C OBPs: 序列中缺失 2 个半胱氨酸位点;
- (5) Atypical OBPs: 具有 9-10 个半胱氨酸位点和长的碳末端。

在鳞翅目中, 还可根据 OBPs 结合的气体分子类型以及存在部位分为(Peng and Leal, 2001; Hekmat-Safe *et al.*, 2002):

- (1) 性信息素结合蛋白 (pheromone binding protein, PBP);
- (2) 普通气味结合蛋白 (general odorant-binding proteins, GOBPs);
- (3) 触角结合蛋白 (antennal binding proteins, ABPX)。

1.2.2 OBPs 研究现状

OBPs 是一类高度分化的蛋白, 在昆虫种间、种内差异极大(Jacquin-Joly and Merlin, 2004; Xu *et al.*, 2009), 其相似性可以高达 90%以上, 也可能低于 10%以下(张治科等, 2017)。OBPs 最初在鳞翅目的触角中发现, 其功能为性信息素的结合蛋白 (PBP) (Vogt and Riddiford, 1981)。但是, 随着科学技术和研究手段的发展, 尤其是基因组学、转录组学的应用以及一些昆虫基因组测序的完成, 越来越多地 OBPs 基因被发现, 证明 OBPs 不仅在昆虫触角中高表达, 在其他部位也有表达, 如胡蜂 (*Polistes dominula*) 和大黄蜂 (*Vespa crabro*) 的 OBPs 在触角、翅和足中均有表达(Calvellido *et al.*, 2005); 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 有 22 个 OBPs 不仅在触角、喙中存在, 在精囊、气门中也有表达(Li *et al.*, 2008); 小地老虎 (*Agrotis ipsilo*) 的 OBPs 在喙和下唇须中也有存在(Shao-Hua *et al.*, 2013); 蝶蛹金小蜂 (*Pteromalus puparum*) 的毒液中也发现有 OBPs 的存在(Wang *et al.*, 2015)。这些研究结果表明 OBPs 除了传递气体分子之外还有更多的功能有待发现与研究。

在功能上, OBPs 表现出更大的多样性。OBPs 在嗅觉系统中的作用主要有以下几种(赵红霞等, 2015):

- (1) 过滤作用: 特异性地识别化学物质, 过滤无用的气体分子;
- (2) 运输作用: 与气体分子形成蛋白复合体, 运输至 ORs;
- (3) 保护作用: 保护气体分子不被淋巴液中的气味降解酶 (ODEs) 降解;
- (4) 失活作用: 使完成刺激的气体分子迅速失活(张瑜等, 2016);
- (5) 营养吸收作用: 黑花蝇 (*Phormia regina*) 中溶解食物中的脂肪酸(Ishida *et al.*, 2013);
- (6) 调控信息素的释放: 在昆虫的生殖器官和信息素合成组织里发现了 OBPs(Sun *et al.*, 2012)等。

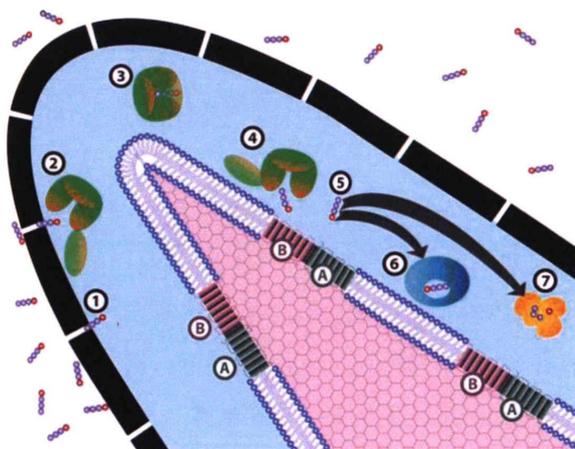


图 1.3 OBPs 结合、释放气体分子示意图(Leal, 2013)

Figure1.3 Schematic view of mechanism of odorant binding, release and inactivation

- 步骤①：气体分子通过扩散进入嗅觉传感器的淋巴液内；
- 步骤②：气体分子与 OBPs 结合；
- 步骤③：形成的气味蛋白复合体穿过感器淋巴液，激活受体；
- 步骤④：激活气味受体，气味受体是以结合位点(B)和共受体(odorant receptor co-receptor, Orco) (A) 组成的异聚体形式起作用；
- 步骤⑤：游离的气体分子猜测可能是被一种未知的分子陷阱⑥或者气体降解酶 (ODE) ⑦消化。

1.3 丽蝇蛹集金小蜂研究概况

家蝇等蝇类由于在取食过程中有边吃、边吐、边排泄的行为特征，极易通过取食等行为传播病毒、真菌、细菌等病原微生物，随之而来的是各种各样的疾病，如炭疽病(Fasanella *et al.*, 2010)、腹泻(Holt *et al.*, 2007)、禽流感(Nielsen *et al.*, 2011)等，对人类的健康具有很大的危害性 (Fotedar, 2001; De Jesús *et al.*, 2004)。而之前对蝇类的防治工作大多以农药处理为主，其结果是导致蝇类对于农药的耐药性越来越高。有研究表明，有些地区的家蝇对敌敌畏或氯菊酯的抗性已达 1000 倍以上(冷培恩等, 2015)。而通过进一步选择性培养基筛选发现，家蝇成虫期的耐药菌多达 12 属，在幼虫期、蛹期、成虫期这三种虫态中一共分离到 20 种细菌，

其中 18 种细菌至少对两种抗生素有耐药性(Wei *et al.*, 2013)。此外, 蝇类昆虫的分布范围广, 适应性强, 用物理手段进行捕杀不仅要耗费大量的人力物力, 而且难以达到很好防治效果。鉴于蝇类的危害性大且防治困难这一现状, 开展蝇类的生物防治工作是十分必要的。

丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 是膜翅目的一种特异性外寄生蜂, 主要寄生蝇蛹, 包括丽蝇、麻蝇等多种蝇类。下一代通过取食蝇蛹内组织, 在其体内完成胚胎期、幼虫期和蛹期等各阶段的发育, 最终导致蝇蛹死亡(薛瑞德等, 1987; 薛瑞德等, 1988)。有研究表明, 从蝇蛹内羽化后, 未交配的丽蝇蛹集金小蜂也可成功寄生蝇蛹, 且不会影响其寄生率和产卵量(张忠等, 2008)。此外, 雌蜂在产卵前会将毒液一同注入寄主体内, 作用是抑制寄主的免疫反应同时还能调节其生理状态(张焘等, 2005), 以保证幼虫在适宜的环境下成功发育。因此, 丽蝇蛹集金小蜂对是很好的蝇类生物防治物种, 具有很好开发利用前景。除此之外, 丽蝇蛹集金小蜂具有繁殖周期短、易饲养、染染色体少、单-双倍体模式等特点, 成为寄生蜂类昆虫研究的模式生物(Shuker *et al.*, 2003; Wurm and Keller, 2010)。

丽蝇蛹集金小蜂体型非常小, 仅 2~3mm, 雌雄之间差异较大, 整体来说雄虫比雌虫体型小, 体色也比雌虫浅, 在显微镜下很容易分辨。

表 1.3 丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫形态差异

Table 1.3 Adult morphological differences of *Nasonia vitripennis*

	雌虫	雄虫
体长	2.2~3.0mm	1.8~2.3mm
体色	大体成墨绿色	稍浅, 大体成翠绿色
触角颜色	棕黄色	浅黄色
足的颜色	腿节大部分为褐色, 其余各节为棕黄色	后足基节为褐色, 其余各节为浅黄色
翅的形态	较长, 可达腹部末端	较短, 不能盖住整个腹部
腹末	钝尖型	钝圆型

丽蝇蛹集金小蜂是继意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 之后膜翅目昆虫中第二个完成全基因组测序的物种(Werren *et al.*, 2010), 这为其在基因组学方面的研究奠

定了基础,如探索基因的结构、功能、表达方式、分析其进化地位等。作为一种模式昆虫,丽蝇蛹集金小蜂为开展基因学、生态学、系统发育、行为研究等相关的实验提供了生物基础(Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019)。

丽蝇蛹集金小蜂作为经典的蝇类寄生蜂,在寄生时会通过毒针将毒液注入寄主体内,来调控寄主的内部环境,如抑制寄主的免疫反应,调节新陈代谢等,为子代寄生蜂创造良好的生长环境(Sim and Wheeler, 2016)。因此,毒液的性质、组成、功能乃至从产生到分泌这一过程中的调节等仍是探究的热点(Rivers *et al.*, 2006; Martinson *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2017)。寄生蜂的毒液中至少含有80中不同的蛋白以及更多的未知功能的多肽及小分子化合物,由此推测其功能的多样性(Danneelset *et al.*, 2015)。但也有研究表明,虽然寄生过程中毒液非常的有用,但却不是必须的(Martinson and Werren, 2018)。而在研究子代性别比例时发现,外界环境(如36°C的高温)影响雄性生育能力,导致子代中雌蜂比例明显下降(Chirault *et al.*, 2015; Chirault *et al.*, 2018)。

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*),革兰氏阴性菌,是昆虫体内最普遍、分布最广泛的胞内共生菌,随母系遗传,可以影响寄主的生殖调控、适合度、寿命、子代性别比等方面(Cordaux *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010; 张艳凯等, 2015)。*Wolbachia*感染丽蝇蛹集金小蜂后会产生多方面的影响,胞质不相容作用(cytoplasmic incompatibility, CI)是最为典型的生殖方面的调控,但是通过多代喂食抗生素(antibiotics)可以消除丽蝇蛹集金小蜂体内感染的*Wolbachia*(Werren and Loehlin, 2009)。与之相关的,无菌蜂的培育也成为研究方向之一(Shropshire *et al.*, 2016)。但近年来在研究*Wolbachia*与寄生蜂之间的关系时发现,*Wolbachia*并不能引起免疫相关蛋白的表达发生显著变化,这可能与两者长期的共生有关(Li *et al.*, 2018)。

1.4 本研究目的及意义

麻蝇、家蝇等蝇类昆虫在人类的生产生活中十分常见。由于蝇类的取食习性,易将其携带的细菌、病毒、真菌等有害微生物通过食物或者直接接触等方式感染人类,对人的健康造成极大地影响。此外,由于蝇类昆虫分布广泛、适应性强、繁殖力高等特点,使得物理防治不能起到很好的效果,而化学防治方法导致了严重的抗药性和环境污染。因此,防治效果好、对环境友好的蝇类生物防治策略成

为新的研究重点。

丽蝇蛹集金小蜂是蝇类的特异性外寄生蜂，在蝇类防治上有很好的应用前景。本文探究丽蝇蛹集金小蜂是如何找到蝇蛹的以及触角在这一寄主定位过程中的作用；同时研究嗅觉相关蛋白—气味结合蛋白（OBPs）在寄生蜂定位寄主过程中的作用，解释相关机理，了解寄生习性和生物学特性，为更好的运用寄生蜂调控蝇类昆虫，进行生物防治提供理论依据。

第二章 丽蝇蛹集金小蜂触角对寄主定位的影响

丽蝇蛹集金小蜂作为一种寄生性的昆虫，主要寄生蝇蛹。在自然条件下，寄主蛹多为紫褐色或者接近黑色，与周围环境之间的色差较小，视觉观察不易发现。因此，对于这一种寄生蜂来说，嗅觉感知在其寄主定位中的作用更大。而触角作为嗅觉感知的主要器官，其上有许多的感器，这些感器调节着寄生蜂与外界环境尤其是一些气体分子之间的联系(Silva *et al.*, 2010)，在整个寄主寻找、鉴定、寄生的一系列过程中，也起着不可忽视的作用。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试虫源

丽蝇蛹集金小蜂、麻蝇、家蝇和黑腹果蝇均为本实验室于室内常年饲养。养虫室的饲养环境为：温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 $80\pm 5\%$ ，光周期为 10h: 14h（光照：黑暗）。

实验室麻蝇种类为棕尾别麻蝇 (*Boettcheriaca peregrine*)，最初为野外诱集获得，后常年饲养于实验室中。麻蝇成虫饲养于 $80\text{cm}\times 80\text{cm}\times 80\text{cm}$ 的养虫笼内，喂以蜂蜜水和奶粉。在 2L 的塑料盒内放入新鲜的猪肝加上奶粉和米糠的混合物来诱导产卵，以及作为提供给幼虫孵化后的食物。产卵一天后，将塑料盒放进装有细沙的储物盒内。一周左右，幼虫爬出塑料盒，在沙子中化蛹。收集化蛹 2-3 天后麻蝇蛹用于寄生，暂时不用则保存于 4°C 冰箱中。

家蝇 (*Musca domestica*)，成虫饲养同麻蝇。诱导产卵时只需将米糠与奶粉混合物放进笼内即可，3 小时后取出放入装有细沙的储物盒内。一周左右，幼虫陆续爬进细沙内化蛹，收集蝇蛹用于寄生，保存于 4°C 冰箱内。

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 品系为野生型，成虫饲养指形管中，喂以红糖和玉米粉等营养物质熬煮出的饲料。幼虫化蛹前将会爬上管壁进行，寄生时用细毛刷取出即可。

丽蝇蛹集金小蜂成蜂置于杯型试管内，喂以 20% 的蜂蜜水。出蜂 2 天后，可用于寄生。按照 1:5 的比例放入寄生蜂雌蜂及麻蝇蛹，寄生一天后将蜂取出。将寄生后的蝇蛹放在养虫室内，若寄生成功，11~13 天后，寄生蜂羽化，从蝇蛹内

破壳而出。

2.1.2 统计标准

行为学实验以直径为 9 cm 的培养皿作为实验场所，观察丽蝇蛹集金小蜂的寄主定位及寄生选择性。

首先将蝇蛹放在培养皿的边缘，再从对角线位置放入寄生蜂，观察寄生行为并统计其寄生率及寄生时间等。实验过程中，培养皿、蛹和蜂均只使用一次。

统计标准：

“找到”：放入寄生蜂的 10 min 内，若观察到寄生蜂爬上蝇蛹即可记为“找到”；否则记为“未找到”；

“寄生”：寄生蜂爬上蝇蛹后，观察到将产卵针刺入蝇蛹即可记为“寄生”；否则记为“未寄生”。

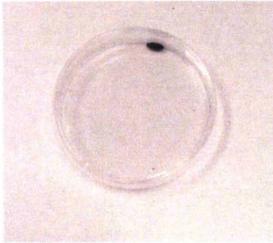


图 2.1 培养皿内放置蝇蛹用于实验
Figure 2.1 Experimental device



图 2.2 寄生蜂寄生麻蝇蛹
Figure 2.2 *Nasonia vitripennis*
parasiting pupa

2.1.3 丽蝇蛹集金小蜂对不同蝇蛹的偏好性

选择化蛹后 2~3 天的麻蝇蛹、苍蝇蛹和黑腹果蝇蛹进行实验。在一个培养皿里放入一个蛹、一头蜂，观察并记录其“找到”蝇蛹时间以及是否有寄生行为。

2.1.4 丽蝇蛹集金小蜂触角切除后对蝇蛹定位的影响

昆虫的触角分为柄节 (scape)、梗节 (pedicel) 和鞭节 (flagellum) 三部分，是寄生蜂嗅觉感知的主要器官，探究在触角整个切除或是部分切除后对丽蝇蛹集金小蜂寻找寄主的影响。收集羽化 2 天后的寄生蜂雌蜂，用冰冻晕后，用解剖针在显微镜下切除触角，切除后喂以 20% 蜂蜜水 12 h 作为恢复时间，挑选行动正常的雌蜂进行后续实验。

触角完整的样品记为 (BA)、触角完全切除的样品记为 (BN)、只保留触角柄节的样品记为 (BN2)、只切除触角 1/3 鞭节的样品记为 (BN3), 如图 2.3 所示。

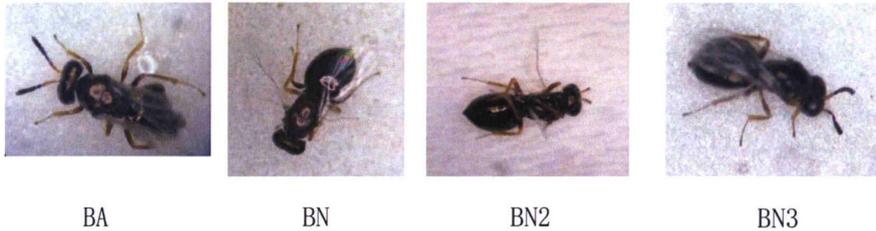


图 2.3 丽蝇蛹集金小蜂触角切除后形态

Figure 2.3 The antennal shape of *Nasonia vitripennis* after cutting operation

2.1.5 分析方法

用寄生蜂是否找到蝇蛹来判断寄生蜂的偏好性及对寄主的定位情况, 统计时 0 表示未找到, 1 表示找到。寄生蜂找到蝇蛹时间是指在 10 min 内寄生蜂爬上蝇蛹的时间。用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析, 用方差分析 (ANOVA) 法检验差异显著情况。分析寄生蜂找到寄主蛹的时间用散点图或是箱图统计, 其余均用柱形图表示。

2.2 结果与分析

2.2.1 丽蝇蛹集金小蜂对不同蝇蛹的偏好性

从丽蝇蛹集金小蜂“找到”蝇蛹的情况来看: 找到麻蝇蛹的概率最高, 其次是家蝇蛹, 最后是黑腹果蝇蛹, 三者之间具有显著差异。由此可以看出丽蝇蛹集金小蜂对 3 种蝇蛹的偏好性: 最喜欢麻蝇蛹, 其次是家蝇蛹, 而黑腹果蝇蛹最低。

由于寄生蜂未对黑腹果蝇蛹产生寄生行为, 因此只对寄生蜂找到麻蝇蛹和家蝇蛹的时间进行分析。从图中可以看出找到麻蝇蛹的时间大多集中在 200 s 以内, 但是 400s~600 s 的时间内也有较多分布, 而整体平均值在 250 s 左右。寄生蜂找到家蝇蛹的时间主要集中在 300 s 以内, 且 300 s 以上的就较少了, 整体平均值在 200 s 左右, 比寻找麻蝇蛹的时间稍短一些, 但是两者之间没有显著差异 ($p = 0.14$)。

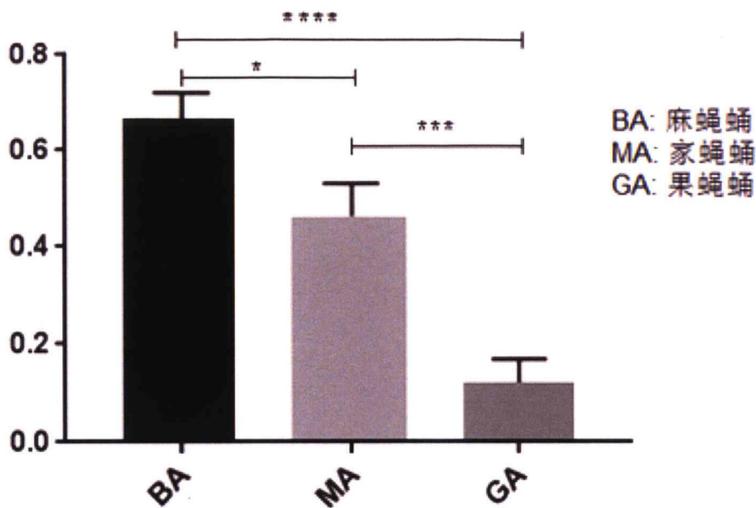


图 2.4 丽蝇蛹集金小蜂找到 3 种不同蝇蛹的概率

Figure 2.4 The odds of *Nasonia vitripennis* finding 3 kinds of pupae

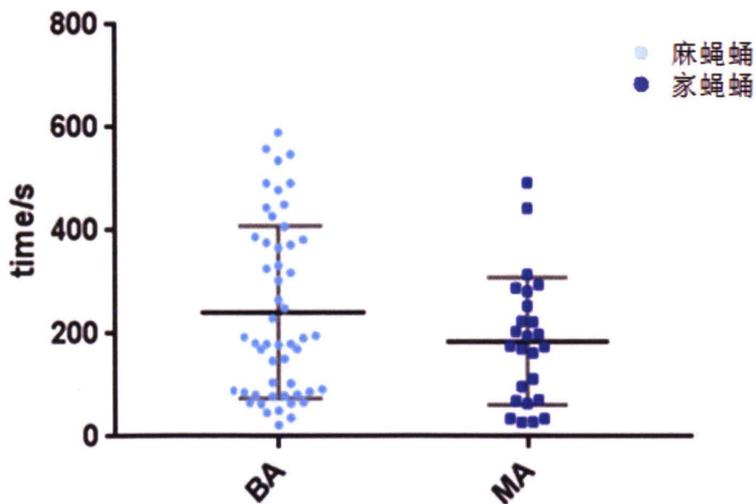


图 2.5 丽蝇蛹集金小蜂找到麻蝇蛹和家蝇蛹的时间

Figure 2.5 The times of *Nasonia vitripennis* finding flesh fly pupae and housefly pupae

2.2.2 丽蝇蛹集金小蜂触角切除后对蝇蛹定位的影响

之前的偏好性实验已经验证丽蝇蛹集金小蜂雌蜂对于麻蝇蛹的选择性更好，因此之后的实验中就以麻蝇蛹作为寄主进行实验，观察触角切除后对寄生蜂寻找寄主的影响。

实验结果表明，对比触角完整的寄生蜂（BA），切除整根触角（BN）后，寄生蜂找到麻蝇蛹的概率大大降低，从 0.7 左右降至 0.3 左右，差异极显著（ $p < 0.0001$ ），这符合实验预期。而仅保留触角柄节（BN2）以及切除鞭节 1/3（BN3）的寄生蜂找到麻蝇蛹的概率却上升了，从 0.7 左右上升至 0.9 左右，差异显著（ $p < 0.05$ ）。

用箱图分析寄生蜂经过触角处理后，找到麻蝇蛹的时间。结果表明，触角完整的寄生蜂（BA）找到麻蝇蛹的时间主要集中在 100 s-400 s 内，最长寻找时间在 600 s 左右，整个数据的中位数在 200 s 左右。触角整个切除的寄生蜂（BN）找到麻蝇蛹的时间主要集中在 50 s-250 s 内，最长寻找时间在 600 s 左右，数据的中位数在 150 s 左右。与触角完整的寄生蜂相比，两者差异不显著（ $p = 0.16$ ）。仅保留触角柄节（BN2）的寄生蜂找到麻蝇蛹的时间集中在 50 s-200 s 内，最长寻找时间在 550 s 左右，其中位数在 100 s 左右。与触角完整的寄生蜂相比，寄生蜂找到麻蝇蛹的时间明显降低，差异极显著（ $p < 0.001$ ）。切除触角鞭节 1/3（BN3）的寄生蜂找到麻蝇蛹的时间集中在 20 s-100 s 内，最长寻找时间在 450 s 左右，其中位数在 50 s 左右。与触角完整的寄生蜂相比，可以看出能够更快地寻找到麻蝇蛹，且结果差异极显著（ $p < 0.0001$ ）。

实验过程还发现了另一实验现象：触角完整（BA）的寄生蜂在找到麻蝇蛹后，即用触角不停敲打蝇蛹表面以确定合适的寄生位置，没有发生中途“下车”的情况。而在触角完全切除（BN）的寄生蜂中有出现找到蝇蛹后未寄生即离开的情况，同样地在仅保留触角柄节（BN2）以及仅切除 1/3 鞭节（BN3）的寄生蜂中也有此现象，但相对较少。因此对触角完全切除（BN）的寄生蜂中这一现象做了相关统计，结果表明，在触角完全切除的寄生蜂中有 20% 左右的存在这一现象，即爬上蝇蛹后不能识别寄主进而再次离开。

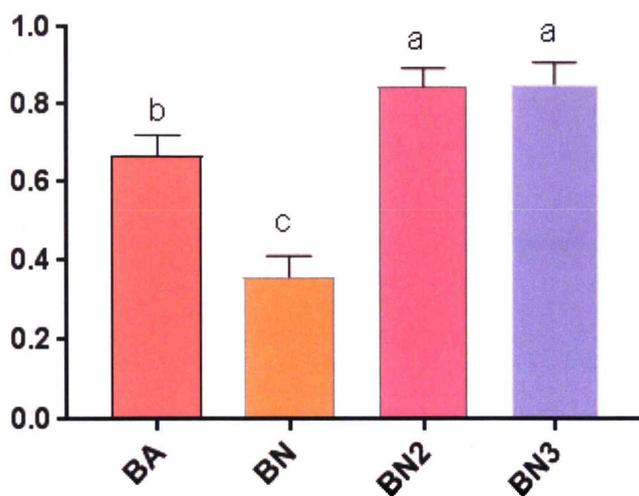


图 2.6 触角处理后丽蝇蛹集金小蜂找到麻蝇蛹的概率

Figure 2.6 The odds of *Nasonia vitripennis* finding flesh fly pupae after cutting antenna

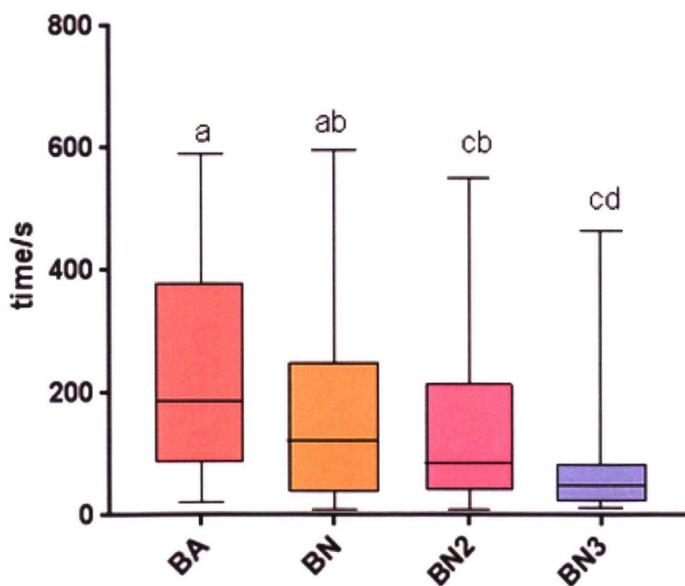


图 2.7 触角处理后丽蝇蛹集金小蜂找到麻蝇蛹的时间

Figure 2.7 The times of *Nasonia vitripennis* finding flesh fly pupae after cutting antenna

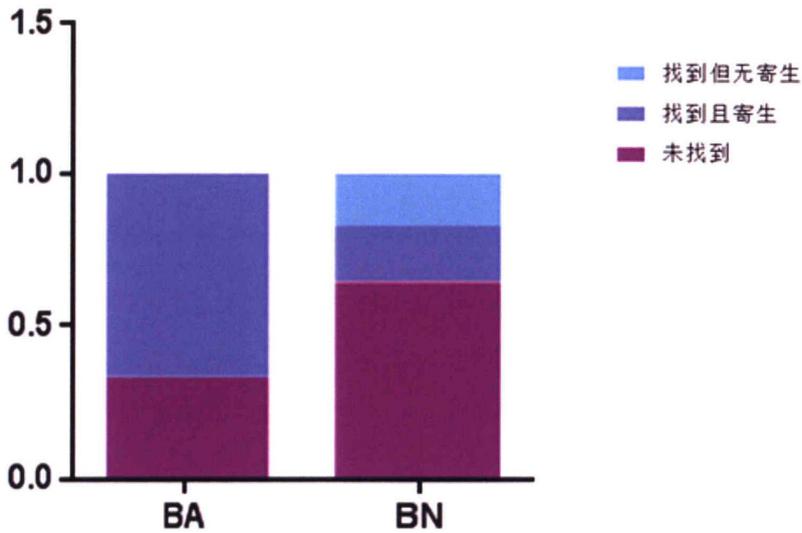


图 2.8 寄生蜂未寄生情况统计

Figure 2.8 Statistics on non-parasitic conditions of *Nasonia vitripennis*

2.3 小结与讨论

丽蝇蛹集金小蜂的寄主范围包括麻蝇、丽蝇、家蝇等多种双翅目蝇类，繁殖时将卵产在蝇蛹内，幼虫通过取食蝇蛹内组织来完成生长发育。之前有研究表明，在棕尾别麻蝇、丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*) 和家蝇中，丽蝇蛹集金小蜂在麻蝇上产卵量最多，寄生率也最高；其次是丝光绿蝇；而家蝇体内产卵量最少，寄生率也最低(张忠等, 2008)。这与上述实验结果相一致。同时，由于黑腹果蝇蛹不在其寄主范围内，因此对其选择性最低。

而通过切除触角的实验中可以发现，在完全切除触角后，寄生蜂找到寄主的比率大大降低，说明触角在寄生蜂寻找寄主的过程中具有定位及识别功能。而在切除部分触角后，不仅寄生蜂找到蝇蛹的比率增加，而且找到的时间也明显降低，这可能是由于切除部分触角后对周边其他的化学信息感知降低，干扰减少；这一实验现象也说明触角的柄节和鞭节部位也具有寄主识别功能。因此在切除触角前端后寄生蜂能更快地对特定化合物，比如麻蝇蛹的挥发物做出反应，进而更快更准确找到特定的寄主。或者在寄生蜂寻找寄主过程中，不仅是嗅觉感知系统在发

挥作用，其他感知系统如视觉感知在触角受损后可能也会起到一定的补偿作用。

同时，对比切除全部鞭节（BN2）以及仅切除 1/3 鞭节（BN3）的寄生蜂数据，发现两者找到比率及时间是差不多的，可以推测可能丽蝇蛹集金小蜂定位麻蝇蛹的关键在触角靠近基部的区域内。

最后实验中的“中途下车”现象表明寄生蜂的触角具有识别寄主并根据反馈确定是否寄生。有研究表明，寄生蜂触角的棒节部位不仅有化学感器，还具有味觉感器。在寄生蜂用触角敲打蝇蛹的过程中，不仅化学感器在执行鉴定功能，机械感器、味觉感器等多种感器联合发挥着作用。这可能解释了触角完全切除的寄生蜂存在着找到寄主后因无法识别或者无法判断是否为正确的寄主而离开蝇蛹的实验现象。

第三章 丽蝇蛹集金小蜂触角 OBPs 初探

昆虫中的气味结合蛋白 (OBPs) 作为一类水溶性的小分子蛋白, 主要功能为运输环境中脂溶性的气体分子到达气味受体 (ORs), 在一些特定的挥发物的识别中具有重要作用(Zheng *et al.*, 2016)。丽蝇蛹集金小蜂中筛选得到 90 个可能的 OBPs 基因(Vieira *et al.*, 2012), 在相关论文的网站可以获得所有基因 (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043034>) 的序列。结合之前行为学实验结果, 探究丽蝇蛹集金小蜂触角上的 OBPs 在其寄主定位和识别中的作用。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试虫源

同 2.1.1

3.1.2 试剂与仪器

用于实验的主要试剂: TRIzol[®] Reagent (ambion); 三氯甲烷 (沪试); 异丙醇 (沪试); 无水乙醇 (沪试); 醋酸钠 (Solarbio); 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)。

试剂盒: *TransScript*[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (全式金); T7 High Yield RNA Transcription kit (Vazyme); Fast Pure Gel DNA Extraction Mini Kit (Vazyme)。

用于实验的主要仪器: 移液枪 (Eppendorf); NanoDrop 2000 (Thermo Scientific); CFX 96 real-time (Bio-Rad); Leica 体式解剖镜 (Leica); PCR 仪 (Bio-Rad); Model 3000 Xi 电泳仪 (Bio-Rad); PROTEAN 3cell 电泳槽 (Bio-Rad); 酶标仪 (Thermo Scientific); 微量注射器 (Drummond Scientific Company) 高速离心机 (Eppendorf); 小离心机 (Eppendorf); -80℃ 冰箱 (New Brunswick Scientific); -20℃ 冰箱 (Haier); 4℃ 冰箱 (Haier); 纯水仪 (Thermofisher); 组织研磨仪 (Qiagen); 无菌操作台 (Airtech); 灭菌锅 (Hirayama); 制冰机 (Scotsman); 凝胶成像仪 (东胜)。

3.1.3 PCR 产物回收与纯化

按照试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (Vazyme) 中方法:

- (1) 凝胶电泳结束后, 在紫外灯下切下含目的条带的凝胶至 1.5ml 离心管;
- (2) 加入同等体积的 Buffer GDP, 在 50-55°C 下震荡水浴 5-10min, 期间注意观察凝胶块溶解情况;
- (3) 将吸附柱装在收集管上, 并将溶液转移到吸附柱中, 如果所有溶液大于 600 μ l, 可分两次装填, 12000g, 离心 1min;
- (4) 弃滤液, 在吸附柱内加入 300 μ l Buffer GDP 到吸附柱洗涤产物, 室温静置 1min 后, 12000g, 离心 1min;
- (5) 弃滤液, 加入 600 μ l Buffer GW (提前加入乙醇), 12000g, 离心 1min;
- (6) 重复步骤 5;
- (7) 弃滤液, 将吸附柱放回收集管, 12000g, 离心 2min;
- (8) 将吸附柱放置在新的 1.5mL 离心管中, 加 10~30 μ l 已 65°C 加热后的 ddH₂O 至吸附柱膜中间, 室温静置 2min; 12000g, 离心 1min;
- (9) 用 NanoDrop 检测 DNA 浓度后, 将其保存于 -20°C。

3.1.4 总 RNA 提取

- (1) 在 2 ml 试管中加入 TRIzol 试剂 (1 ml TRIzol 试剂可用于 50-100 mg 样品的 RNA 抽取), 将切下的组织并灭菌后的钢珠放入, 用组织匀浆仪进行匀浆;
- (2) 将匀浆后样品室温 (15~30°C) 静置 5 分钟, 使核酸蛋白复合物完全分离;
- (3) 每使用 1 ml TRIzol 加入 0.2 ml 三氯甲烷, 合紧盖子后剧烈震荡 15 秒, 室温静置 3 分钟;
- (4) 离心机提前预冷, 4°C, 12000g 离心 15 分钟。离心后样品分为三层, RNA 主要在最上层的透明水相中;
- (5) 轻轻吸取上清于新的 1.5 ml Eppendorf 离心管中, 每 1 ml TRIzol 加入 0.5 ml 异丙醇, 夹在两板间上下颠倒 20~30 次, 室温静置 10 分钟;

- (6) 4°C, 12000g 离心 10 分钟, 弃上清;
- (7) 加入 1ml 75% 的乙醇, 洗涤 RNA 沉淀, 4°C, 7500g 离心 5 分钟, 弃上清;
- (8) 室温放置干燥 RNA 沉淀。加入 10-40 μ l RNase-free 的水对 RNA 进行溶解; 或加入 100%乙醇, -80°C 保存;
- (9) 利用 NanoDrop 检测 RNA 的纯度 (OD260/OD280 比值)。

3.1.5 cDNA 合成

按照试剂盒 *TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix* 说明: 反应体系为 20 μ l:

2×TS Reaction Mix	10 μ l
Anchored Oligo(dT)18 Primer	1 μ l
Random Primer	1 μ l
TransScript [®] RT/RI Enzyme Mix	1 μ l
gDNA Remover	1 μ l
mRNA	x μ l (1000 ng)
RNase-free Water	(6-x) μ l

PCR 程序为:

25°C	10 min
42°C	1 h
85°C	5 min
4°C	forever

用于 qPCR 前, 需将得到的 cDNA 稀释 100 倍。

3.1.6 实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)

丽蝇蛹集金小蜂总 RNA 提取后, 取 1000ng 总 RNA 进行反转录, 将获得的 cDNA 稀释 100 倍后用于定量 PCR 检测, 以蝶蛹金小蜂的 18S rRNA 作为内参基因。用 Primer3 网站 (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) 设计定量引物, 并送到上海生工生物工程股份有限公司进行合成。

定量反应采用 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (Vazyme), 体系为 20 μ l:

2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix	10 μ l
正向引物	1 μ l
反向引物	1 μ l
稀释后的 cDNA 模板	2 μ l
双蒸水 (ddH ₂ O)	6 μ l

qPCR 反应程序为:

预变性	95°C, 30s
40 个循环	95°C, 10s
	60°C, 30s
溶解曲线	95°C, 15s
	60°C, 60s
	95°C, 15s

反应完成后, 用 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 方法 (Schmittgen and Livak, 2008), 将得到的 Ct 值转换成各个样品的相对含量。

内参基因 18S 引物序列如下:

18S rRNA	F: CGAGCGATGAACCGACAG
	R: CGGGGAGGTAGTGACGAA

表 3.1 用于定量 PCR 的 90 个 OBPs 基因引物

Table3.1 Primers used for qPCR of 90 OBPs

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP01	F: TGGTTCCTCGGCGTCATCAAA	60.0	274 bp
	R: TCATCGGCGTGTTCCTTGAA	60.0	
NvitOBP02	F: GGCCAATCGCTACTACTGCT	59.9	269 bp
	R: ATGCCGTTGAGACTCAGCTC	60.1	
NvitOBP03	F: AGTCGGAGTTCGCGACAAAT	60.0	219 bp
	R: ATCATCTCGTCGGCGTGATC	60.0	
NvitOBP04	F: GCCTCGTTCAAGGACTCCAA	60.0	223 bp
	R: GGAAGAACAATCGCGCCATC	60.0	
NvitOBP05	F: CGGCATCGGAGAAACAGAGA	59.8	243 bp
	R: AGCGTTATGTGTGCGGGTAA	60.0	
NvitOBP06	F: GCCCCCTTTCACGAGACATT	60.3	239 bp
	R: GGCATTTGCTTGAGAGTCGG	59.6	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP07	F: GCGAACTGAAGCCAGCTTTC	60.1	244 bp
	R: TTGTTAGCGCACTCGGTGAT	60.0	
NvitOBP08	F: CAAGTGTTTCCACGCATGCA	60.0	238 bp
	R: GCGATGATGATGAGGAGGGG	60.0	
NvitOBP09	F: TTCGACCCACAGCAATACCC	60.0	176 bp
	R: AGCGTGTCGAGGTTTCATGTT	60.0	
NvitOBP10	F: AGCGAAATGTTATGCGTCGTG	59.9	187 bp
	R: ATGGCCAGTGTCACAATCGT	60.0	
NvitOBP11	F: TCAGCGCCGTATTCATGGTT	60.1	129 bp
	R: TGCTTCTCATGTCGACTGCA	59.7	
NvitOBP12	F: TGGTTCGACTGCGTTTACGA	60.0	200 bp
	R: CGGTGTCAACTGTCCCATCA	60.0	
NvitOBP13	F: AGCGTTTCTGGGATTACGTG	60.1	177 bp
	R: TCGTACCGTCCGGTCTCATA	59.8	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP14	F: GCGAACTGAAGCCAGCTTTC	60.1	244 bp
	R: TTGTTAGCGCACTCGGTGAT	60.0	
NvitOBP15	F: ATAAAAGGGGCTGCCTGGTC	60.0	174 bp
	R: AGTCCCCGAGCTTGCAGAAA	59.9	
NvitOBP16	F: TAATCCCACCCTGTCTTGCG	59.7	269 bp
	R: AGCTCTGCATGCTTCGGTAG	60.2	
NvitOBP17	F: GCCATGTGCATCATCGGAAC	60.0	230 bp
	R: ACAGTTTCGTCCATGGACCC	60.0	
NvitOBP18	F: AAGCGTCAAGAAGGGAGAGC	60.0	114 bp
	R: ACTTCCTCGTTGACGGTTCC	60.0	
NvitOBP19	F: ATAAAAGGGGCTGCCTGGTC	60.0	174 bp
	R: AGTCCCCGAGCTTGCAGAAA	59.9	
NvitOBP20	F: GATCCAGCGGTGCTCGATAT	59.8	121 bp
	R: CGTCCTTGAGCCAGTCGAAT	60.1	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	T _m (°C)	Products length
NvitOBP21	F: AGAACACAGCTTTCCGCAGT	60.2	238 bp
	R: ACCGTCGGTCAAAACTTCGA	59.9	
NvitOBP22	F: TGATCCTGCGGTCCCTGAAC	60.0	169 bp
	R: TTCTGGCGTCTCACCTTCAC	60.0	
NvitOBP23	F: TCCAGGTCCTAATAACCCCACT	60.0	190 bp
	R: CCGTTGTTTGCACATGCTGA	60.0	
NvitOBP24	F: AGGCAGTAACGGCACTAACC	60.0	182 bp
	R: TCCCTCACTGCATGCATTGT	60.0	
NvitOBP25	F: TGCGGAACTATGCTCGGTTT	60.0	167 bp
	R: CTCGCATTTCTCACGTGTGC	60.2	
NvitOBP26	F: TTGCATCGTTGGCGCTTATG	59.9	159 bp
	R: CAGTCGAGCTTTTCATCGCG	60.0	
NvitOBP27	F: CTCGAACGTTTGGGGTGAGA	60.0	154 bp
	R: ATCGCCGTTTCAGCAAAATCG	59.9	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP28	F: TCGTAATCGTGGCTCTCTGC	59.9	214 bp
	R: ATTGCCGCCACGTCATAAGA	60.1	
NvitOBP29	F: CGAAGTTACCGAGTCGTCGT	59.8	159 bp
	R: TGCAGGTCTTCGACAGCTTT	59.9	
NvitOBP30	F: GCGAATATCAGGCTGACCGA	60.0	134 bp
	R: CAGGACTTTTGCTCCTCCGT	60.0	
NvitOBP31	F: TCTGCCAATCGCCATCTGTT	60.0	229 bp
	R: AAAACAGGCAACAGCACACG	60.2	
NvitOBP32	F: TGCTTGCGCAAAAATGGGTT	60.2	284 bp
	R: TTACAGTCGTCGCCTTCGTC	60.1	
NvitOBP33	F: ACTGCCCCCAAAGAACAACA	60.0	223 bp
	R: TGACACGCGTAAGTTCCTGA	59.3	
NvitOBP34	F: ACGACAAATTAAGCGACGCG	59.9	133 bp
	R: ATCCAGACGAAAGGTGGCTG	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP35	F: CGGCAACTGGAGCAAAAAGAC	60.0	288 bp
	R: CTTCGGCATTGCAGCTCTTC	59.9	
NvitOBP36	F: CATTGACTGCTGCAGCGAA	59.8	120 bp
	R: CATCGGCTGCACCTCAGTAT	59.9	
NvitOBP37	F: AGAACAGCAACGGGAGTGTT	59.8	279 bp
	R: TGCCGGTGACAATGATCCAA	60.0	
NvitOBP38	F: CTTCGTTTGCAAACCGAGCA	60.0	174 bp
	R: ATGCAGGCGAAAACCTCCAGA	60.0	
NvitOBP39	F: TGCAACGCAAATGCTACTGG	59.8	287 bp
	R: GGCGGGCTGAGTCGATTAAT	60.2	
NvitOBP40	F: TGCAGGACGTTTCGATGGAA	60.0	234 bp
	R: CGTCAAACGGAGGAGCCATA	59.8	
NvitOBP41	F: AGACATTACCGAGCCTCCCT	60.0	261 bp
	R: TTGATCAGGTCGGCAAGTCC	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP42	F: GCAACACAAATGCTGCTGGA	60.0	295 bp
	R: TCTTCGGGGACATGCTTCAC	60.0	
NvitOBP43	F: TTGGGTTCGCTTTGCAAGTG	59.9	200 bp
	R: GTACATGCAGGCCAAAACCG	60.1	
NvitOBP44	F: GACAAGCTGTACCCACACCA	59.9	237 bp
	R: GCACCACTGCAAAGCTTGTT	60.2	
NvitOBP45	F: AAGCGTATCGGCACAGACAA	60.0	166 bp
	R: TATAGCACTTCTCCAGCGCG	60.0	
NvitOBP46	F: ACTAAGAGCAGCCTACCGGA	60.0	103 bp
	R: CGCACTTTCCGA ACTTGCAA	60.0	
NvitOBP47	F: TTCGACGACTTCACGCAGAA	60.0	105 bp
	R: CATCTCTTTGCGTTCGCTCG	60.0	
NvitOBP48	F: TCCCTCGGCAGCGTAAAATT	60.0	299 bp
	R: TCCCTGGCGACAACAAAAGT	60.1	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP49	F: AGGCGTTCCGACAACCTTGAA	60.2	156 bp
	R: AAAGGAACACGCCAAAGTGC	59.9	
NvitOBP50	F: ACGTTCCTGGTCGTTTTGT	60.1	148 bp
	R: AAATTCGCCCTTTCCACCT	59.9	
NvitOBP51	F: GGATCACGTGCGGACAAAAG	59.8	156 bp
	R: GCAAGCCAATGCCTCTTCAG	59.8	
NvitOBP52	F: CGATAAGGCCATTGCAACCG	60.0	109 bp
	R: ATCATCGCCAGCTTCTCGAG	60.0	
NvitOBP53	F: ATTGCCCCCTACGATTTGGG	60.1	247 bp
	R: GCGCAAATGGAAGTTCCCAA	59.7	
NvitOBP54	F: TGCTCGACCCAACTCAGAAC	60.0	140 bp
	R: TCTCATCGTCGGTCAAGCTG	59.8	
NvitOBP55	F: GGGCTCGATCCAGATTTCTGT	59.9	271 bp
	R: GCTCCTTGTTCCGTCTGACA	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP56	F: ACGTCTATTCGGGCCAAAA	60.0	118 bp
	R: GGCAGTGTTTTTGTGCGTCT	59.9	
NvitOBP57	F: AAGACGTCAACTCGTGCCAT	60.0	160 bp
	R: GCGCTTTCATGTGCTCCAAT	59.8	
NvitOBP58	F: GCCTACAAAGGGACCAGGAC	60.0	209 bp
	R: CGCTGGATTGTCCGAGATGA	59.9	
NvitOBP59	F: TACTTCCCTCGTTGCAGCTG	60.0	194 bp
	R: TGGCCTTGCATCTTTCGGAT	60.0	
NvitOBP60	F: AAAGTTCCAGACGAGCCAGG	60.0	147 bp
	R: CCGGTGTGTTAGTCGGAACA	60.0	
NvitOBP61	F: AGATGCCAGACGAGCTAGGA	60.1	146 bp
	R: TGGGTACATCGGTCCGTACA	60.3	
NvitOBP62	F: ACCCCAAAGCCCACAAATGA	60.1	243 bp
	R: GGAGTCAAGCCCATCACCAA	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP63	F: GCTCGACTAAATGCCTTCGC	59.7	233 bp
	R: CGAGAAAGCGCCAAAACCAT	59.8	
NvitOBP64	F: TCGAGTTATGTGCGTCACCC	60.1	266 bp
	R: CATCCCAGTCCTCGCATCTC	60.0	
NvitOBP65	F: TGGAGTCTTTTCGGACGACG	60.0	147 bp
	R: AAGCAATCGATTTCCCGGGT	60.0	
NvitOBP66	F: GATGCACACCCCTGACTTCA	60.0	222 bp
	R: AACACATCCATGACGCCCTT	60.0	
NvitOBP67	F: GTCTCACGTTCTGAGTCCA	59.0	139 bp
	R: AGGTTGGGTGTTGAAGTCCG	60.2	
NvitOBP68	F: AAGTCTGGCATTCCCGAGTC	59.7	120 bp
	R: GTTGCGTAACAAGCCCATCA	59.1	
NvitOBP69	F: CTCTCGATGAGGAGGAACGC	60.0	293 bp
	R: GCAGCCATTTTGTCCAAGCA	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP70	F: TGGACCAATCAACGTTGCAA	58.6	167 bp
	R: TCGACATATCTAGCGTGGCG	59.8	
NvitOBP71	F: CGGACTTGACGGAAGACCAA	60.0	208 bp
	R: CCTCCTCGGACATGAATCCA	59.5	
NvitOBP72	F: CCATTGCAAATGATCGCGGT	59.9	138 bp
	R: CCACGTTTTCCACCATGCAC	60.3	
NvitOBP73	F: AGTATGCCGAGAGAAATGACGT	59.6	111 bp
	R: GGTTTTTGATTGAGCATCCGACA	60.1	
NvitOBP74	F: GCAGAAGGCTAAAGGATGTCG	59.1	123 bp
	R: GGTTTTTGATTGAGCATCCGACA	60.1	
NvitOBP75	F: AGTCCCACGATAGGCCAGAT	60.1	141 bp
	R: TATTATCACGTCCAGCGGGC	60.0	
NvitOBP76	F: TTGGTCGACGAAGAAGCGAA	60.0	160 bp
	R: TCTCCATGACACACTTGCC	60.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP77	F: CCTAGATCTGGCTGCGTCAC	60.2	224 bp
	R: GGAGTCCGCAAGCACTTTTG	60.0	
NvitOBP78	F: AGGTCGTGGAGGTGGAAGTA	59.5	272 bp
	R: TGCAAGAGAGCATGGCAGTT	60.3	
NvitOBP79	F: CCGAAAATGCGTTGCCTCAT	59.8	167 bp
	R: TCGTTTGCTCCATCGACACA	60.0	
NvitOBP80	F: GCGAAAAAGCACGTTTCAGGA	59.7	273 bp
	R: TCCAGCAACCAGACATTCGT	59.6	
NvitOBP81	F: ACCCGTAGAAGACCGAGTAGT	59.7	174 bp
	R: AATGCTTCCACGTCCGACTT	60.0	
NvitOBP82	F: AGAAGGTGGAATGCGCTCAA	60.0	245 bp
	R: ATCACCGCTGGCTTGATCAA	60.0	
NvitOBP83	F: TGGACAATCCCCGAAGACG	60.0	265 bp
	R: TGGGAAGAAGTACAGCTCGC	59.8	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	PCR 产物长度
Primer name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	Products length
NvitOBP84	F: AAATGGTCGCGGCTACTCAT	59.8	224 bp
	R: AGCGTCATTAGTTGGTGCGA	60.0	
NvitOBP85	F: AAAGCGTGCTTGGCTGAAAG	60.0	191 bp
	R: ACTTTGCCAATCTCCTGCGA	60.0	
NvitOBP86	F: TGGAAAAGCCGTTTACGTGC	59.7	117 bp
	R: TAGCTGGAATTACGTGGCCG	60.2	
NvitOBP87	F: TGAATGCCTTCGTGCTTGTT	58.7	184 bp
	R: TCTTGTTACACCGCACTCGT	59.6	
NvitOBP88	F: TCGCAGCCAAGAAGTATGGA	59.1	116 bp
	R: GTGCAAGCAAGAACGCATCT	59.8	
NvitOBP89	F: ACGTGGCATTTCGATATGGCT	59.9	154 bp
	R: ATTAATCCGTCGGCAAGGCA	60.1	
NvitOBP90	F: GCTCGTCGAGGGAATAAGGG	60.0	103 bp
	R: GCCTTGCTTCGTGAACGTTT	60.0	

3.1.7 dsRNA 的合成与纯化

以带有 T7 启动子的 DNA 片段作为体外转录的模板，反应体系为 20 μl ：

10×Reaction Buffer	2 μl
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl
ATP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
DNA 模板	2 μl
RNase-free Water	6 μl

用移液枪轻轻混匀各组分，并短暂离心收集，37℃ 孵育 4 h。

dsRNA 纯化步骤：

- (1) 在产物中加入 160 μl RNase-free Water 稀释至 180 μl ；
- (2) 加入 20 μl 3M 的醋酸钠 (pH 5.2) 溶液至稀释后的产物中，用移液枪吹打充分混匀；
- (3) 按照 1:1 的比例加入 200 μl 的酚/氯仿混合液 (25:24:1) 进行抽提，4℃，10000 rpm，离心 5 min，将上层溶液转移至新的 RNase-free EP 管中；
- (4) 加入 200 μl 等体积的氯仿充分混匀，4℃，10000 rpm，离心 5 min，收集上层水相；
- (5) 加入 200 μl 等体积的异丙醇，轻轻混匀，-20℃ 孵育 30 min，4℃，15000 rpm 离心 15 min，弃上清；
- (6) 加入 500 μl 预冷的 70% 乙醇洗涤 RNA 沉淀，4℃，15000 rpm 离心 15 min，弃上清；
- (7) 开盖干燥 2 min，加入 20-50 μl RNase-free Water 溶解 RNA 沉淀；-80℃ 保存。

3.1.7 实验方法

根据整根触角切除后，寄生蜂的寄主定位效率大大降低这一实验现象，对丽蝇蛹集金小蜂的 90 个 OBPs 基因进行定量分析，找出在触角中高表达的基因。由于之前的行为实验结果表明，丽蝇蛹集金小蜂触角上具有影响其寄主定位的

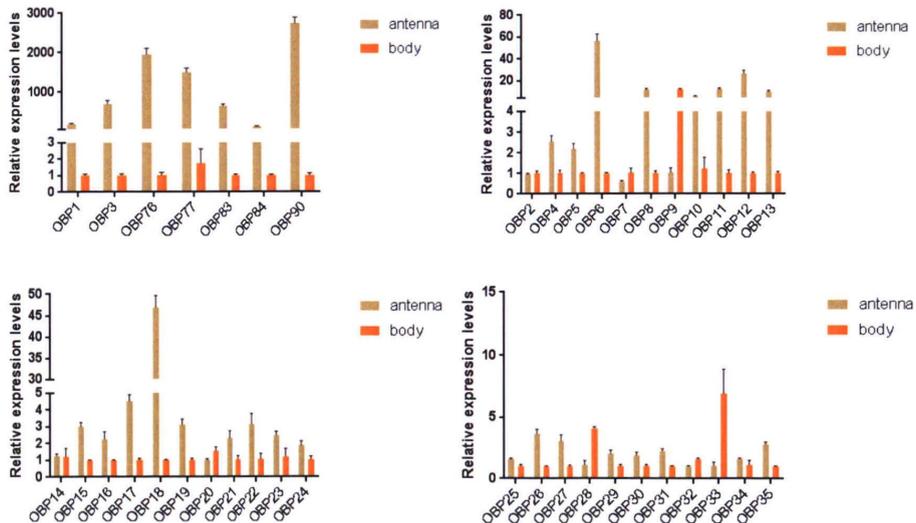
基因存在，但是只切除鞭节部分并不能显著影响其识别寄主的能力，因此进行 2 次定量实验分析：(1) 选择同一批的雌蜂，在显微镜下分离触角和残体两部分。对触角与残体进行比较，每组设置 3 个生物学重复，由于寄生蜂的触角非常细小，每个样品需 200-300 头雌蜂触角；(2) 选择另一批同一时间羽化的雌蜂，仅头部与带有触角柄节和梗节的头部进行比较，每组设置 3 个生物学重复。分别找出 2 次定量结果里在触角中高表达的基因进行后续实验。

为探究 OBPs 的功能，将设计 dsRNA 进行 RNA 干扰。选择被寄生后 9~10 天的麻蝇蛹，取出里面的寄生蜂蛹，此时蛹状态多为黄蛹阶段，可看到眼睛为红眼，有部分寄生蜂蛹眼睛渐变为黑色。注射 dsRNA 后，室温孵育两天，待出蜂后观察表型有无变化；用定量 PCR 测定基因的转录水平，统计并分析干扰效率；其他羽化的寄生蜂用 20% 蜂蜜水饲喂两天后进行行为学实验观察。

3.2 结果与分析

3.2.1 丽蝇蛹集金小蜂 OBPs 定量结果

(1) 仅触角 (antenna) 与残体 (body) 进行比较，分析得到有多个 OBPs 基因在触角中显著高表达，其中 OBP1、OBP3、OBP76、OBP77、OBP83、OBP84、OBP90 这 7 个基因表达量最高，因此选择这 7 个基因进行 RNA 干扰实验。



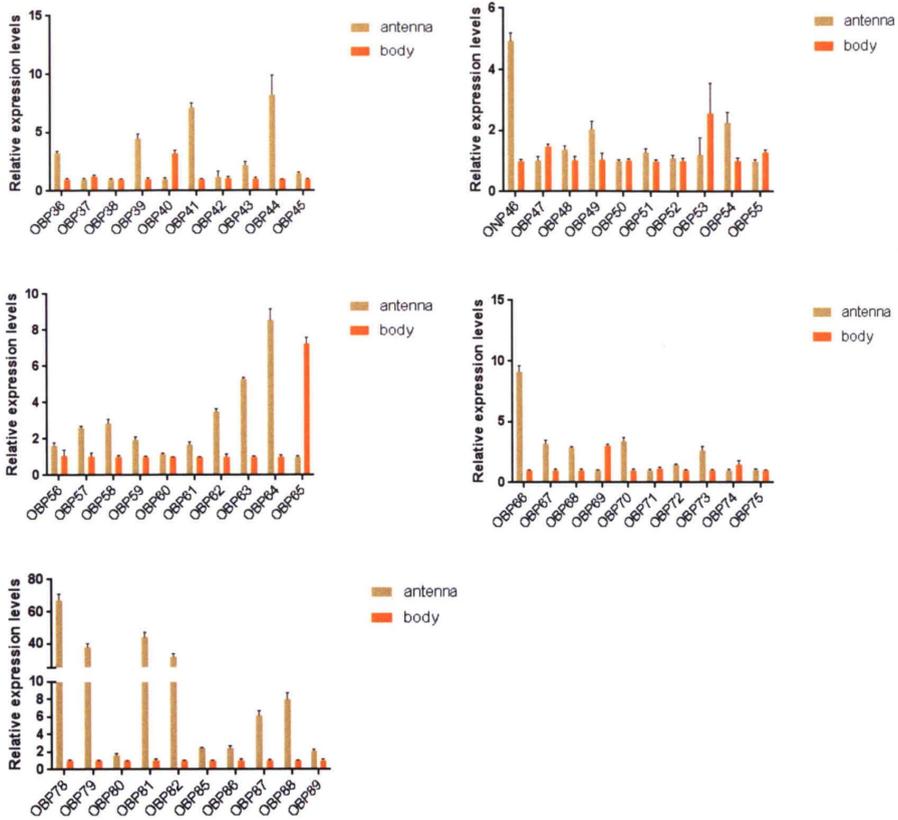
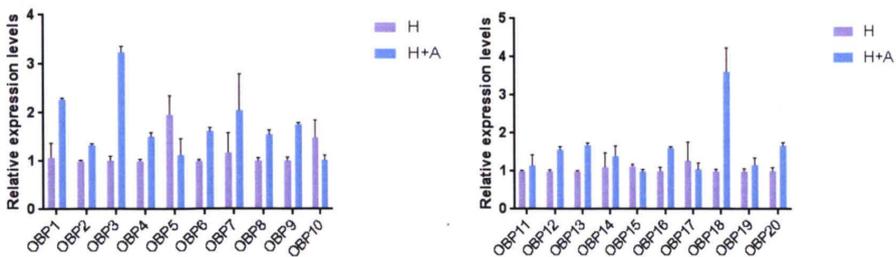


图 3.1 丽蝇蛹集金小蜂 OBPs 在触角和残体中的表达量

Fig. 3.1 Expression profiles of OBPs in antenna and body of *Nasonia vitripennis*

(2) 头部(H)与带有触角柄节的头部(H+A)比较: 定量结果表明: OBP1、OBP3、OBP18、OBP26、OBP34、OBP41、OBP43 这 7 个基因在触角中显著高表达, 而 OBP5、OBP57、OBP67、OBP85、OBP86 这 5 个基因在寄生蜂头部显著高表达, 之后将选择触角中高表达的基因进行 RNA 干扰实验。



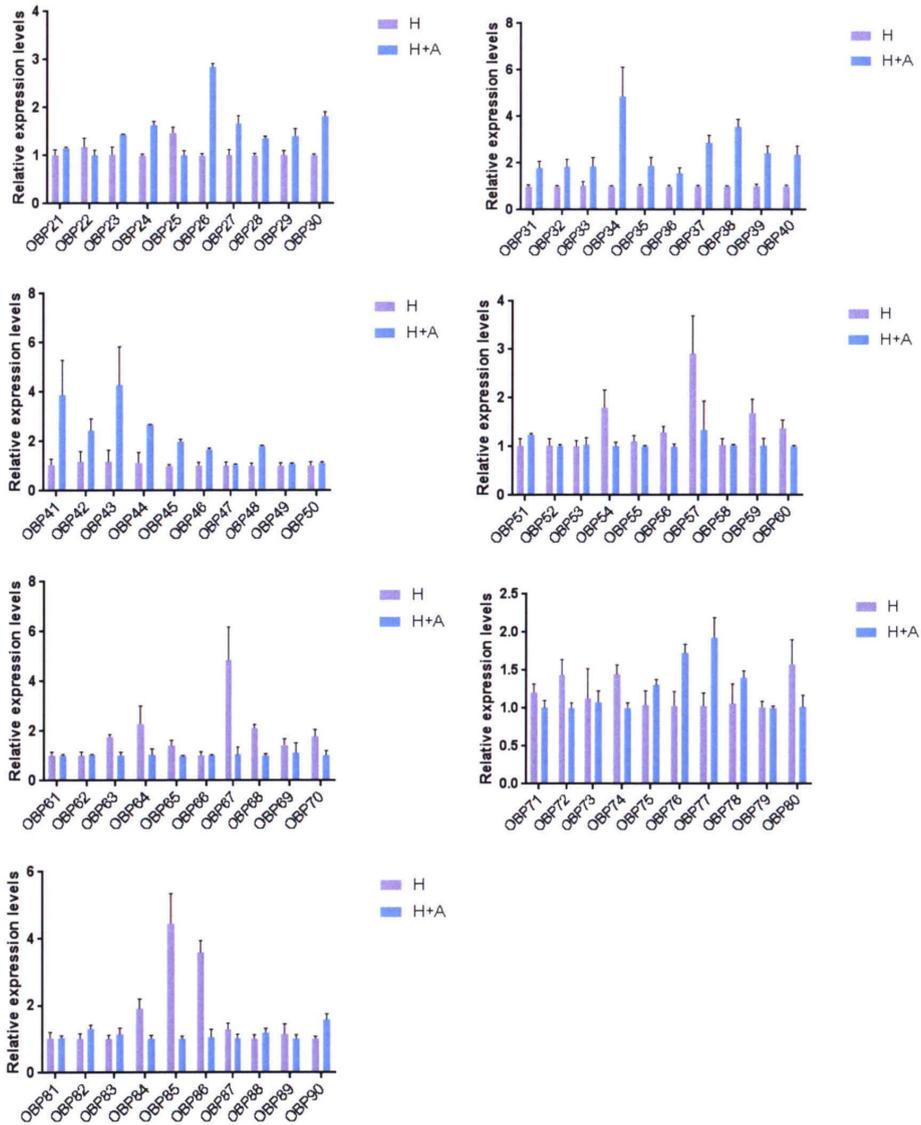


图 3.2 丽蝇蛹集金小蜂 OBPs 在触角与头部的表达量

Fig. 3.2 Expression profiles of OBPs in antenna and head of *Nasonia vitripennis*

3.2.2 RNA 干扰效率分析

RNA 干扰引物设计时需要主要避开之前定量引物的设计位点, 以免对后续的干扰效率的检测造成影响。在注射 dsRNA 后, 细胞内的同源 mRNA 会被降解, 从而使相应的基因呈现出表达抑制的现象, 这一现象在注射两天后达到最高。因此选择 RNA 干扰两天后用荧光定量 PCR 检测 RNA 干扰效率。

表 3.2 用于合成 dsRNA 的引物

Table3.2 Primers used for dsRNA synthesis

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	合成 ds-RNA 长度
Primer Name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	length of ds-RNA
T7-OBP1	F: TAATACGACTCACTATAGGGTGGTCGTGGTTCTCG	46.0	277 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG TCGGCGTGTTCCCTT	45.9	
T7-OBP3	F: TAATACGACTCACTATAGGG TGCTGCTGTGCTTC	49.9	312 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG TACACGCCGCGATC	47.8	
T7-OBP18	F: TAATACGACTCACTATAGGG TCCTTCGCCGTTAT	42.5	357 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG CAAGACCTTTCCTCC	49.8	
T7-OBP26	F: TAATACGACTCACTATAGGG AGACCTTCGCTATTGT	40.6	336 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG CCTTTCCTTGAGAT	39.7	
T7-OBP34	F: TAATACGACTCACTATAGGG ATGGGCTGTATGTG	34.5	221 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG AGATACCCCAAAT	33.0	
T7-OBP41	F: TAATACGACTCACTATAGGG AAGTTGGTGGAAAG	33.6	444 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG CTATGAAAGGTGGTT	34.0	

引物名称	引物序列 (5' -3')	退火温度	合成 ds-RNA 长度
Primer Name	Primer sequences (from 5' to 3')	Tm (°C)	length of ds-RNA
T7-OBP43	F: TAATACGACTCACTATAGGG TATTGGGTTTCGCTTTG	46.8	484 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG TCCGCATCTTTCGTAG	46.4	
T7-OBP76	F: TAATACGACTCACTATAGGG GCACTGGTCGTCTTG	42.0	234 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG GTTCGCTTCTTCGTC	41.4	
T7-OBP77	F: TAATACGACTCACTATAGGG ACGGCGTGTATCAT	38.4	217 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG TGTTGGCTCTTGGA	39.0	
T7-OBP83	F: TAATACGACTCACTATAGGG ACTACCGAATCCAA	44.1	302 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG ACTTTCAGCGACAT	43.5	
T7-OBP84	F: TAATACGACTCACTATAGGG GGAGTTTCCGATGA	37.3	250 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG AAGCGTAGGCACAA	39.9	
T7-OBP90	F: TAATACGACTCACTATAGGG CGAGGGAATAAGGG	41.3	273 bp
	R: TAATACGACTCACTATAGGG AAGTAGACCGCTGGAT	43.4	
T7-GFP	F: TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGA	69.9	
	R: TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCAGAAGAACGGCATCAA	68.0	

(1) 第一次选择 OBP1、OBP3、OBP76、OBP77、OBP83、OBP84 这六个基因进行 RNA 干扰，合成 dsRNA 浓度为 3500 ng/ μ l，注射计量为 30 nl，每个基因注射 30 个黄蛹，两天后检测干扰效率。qPCR 结果表明，这六个基因的转录水平没有明显的下调趋势，最终计算得干扰效率分别为 21%、3%、24%、16%、9%、17%，与对照组 (GFP) 相比差异不显著。

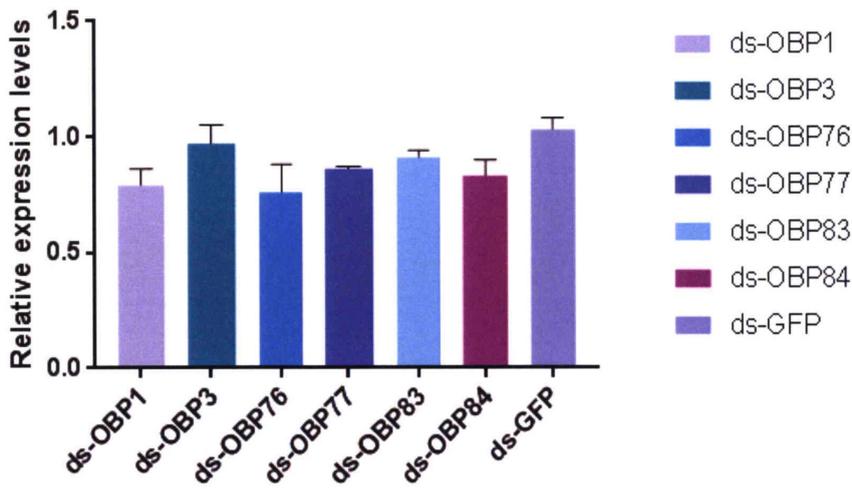


图 3.3 RNA 干扰 2 天后基因表达水平

Figure3.3 The expression levels two days after injection

(2) 第二次选择 OBP18、OBP26、OBP34、OBP41、OBP43、OBP90 这六个基因进行 RNA 干扰，合成 dsRNA 浓度为 3500 ng/ μ l，注射计量为 40 nl，每个基因注射 30 个黄蛹，两天后检测干扰效率。qPCR 结果表明，OBP26、OBP41 这两个基因的转录水平有明显的下调，干扰效率分别为 65%、77%，与对照组相比，差异显著 ($p < 0.05$)。而 OBP34、OBP43 两个基因的转录水平有下降趋势，但差异不显著，干扰效率分别为 39%和 41%。最后两个基因 OBP18、OBP90 的转录表达量，没有检测到明显的下调趋势，干扰效率为 4%，15%。

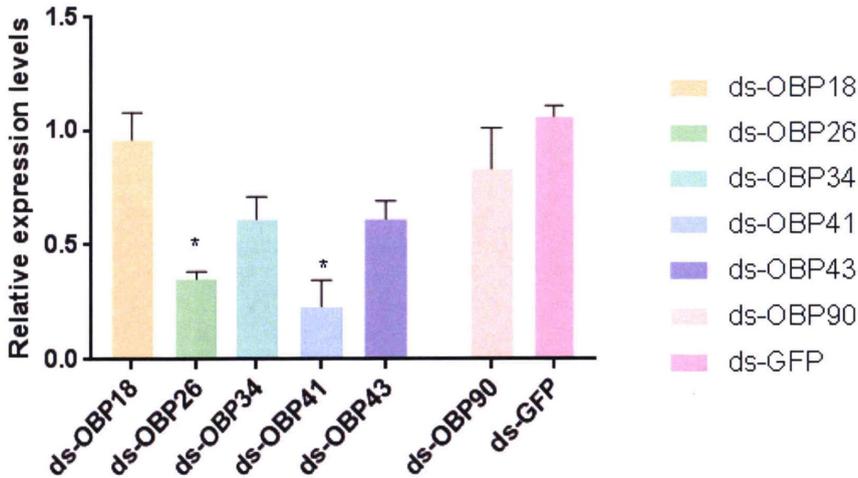


图 3.4 RNA 干扰 2 天后基因表达水平

Figure3.4 The expression levels two days after injection

3.2.3 显微镜观察丽蝇蛹集金小蜂形态变化

根据 RNA 干扰结果，OBP26、OBP41 两个基因是干扰效率最高的，收集这两个基因干扰后羽化出的寄生蜂，在体视显微镜在观察触角的形态变化。结果表明，与注射 GFP 以及未注射的寄生蜂相比，两者的形态没有明显差异。

3.2.4 行为学验证 RNA 干扰效率

将 RNA 干扰后的黄蛹放于指型管中，待羽化后收集成虫。选择 RNA 干扰效果显著的组别，即基因 OBP26、OBP41 两组的成虫，除去未羽化的以及用于定量 PCR 验证干扰效率的寄生蜂，可用于行为学验证的寄生蜂数量为 15 头左右。按照第二章的实验方法，统计寄生蜂找到麻蝇蛹的概率以及找到时间。对照组为注射 GFP 基因的寄生蜂。结果表明：与对照组相比，另外两组的寄生蜂找麻蝇蛹的概率都在 70%~75%之间，与对照没有显著差异。而统计三组寄生蜂找到麻蝇蛹的时间时发现，三组的分布趋势是一致的，在 0~600 s 之间均有分布，主要集中在 300 s 以内；OBP26、OBP41 两组寄生蜂找到麻蝇蛹时间的平均值在 200s 左右，对照组（GFP）在 150 s 左右，略有升高，但三组之间差异不显著。

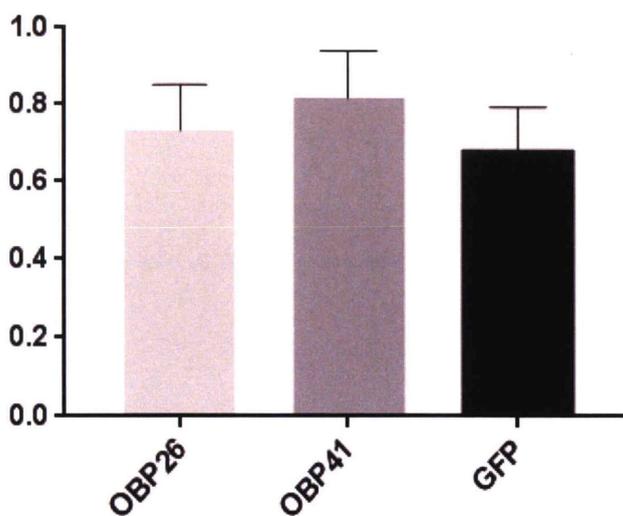


图 3.5 RNA 干扰后丽蝇蛹集金小蜂找到麻蝇蛹的概率

Figure3.5 The odds of *Nasonia vitripennis* finding flesh fly pupae after RNA interference

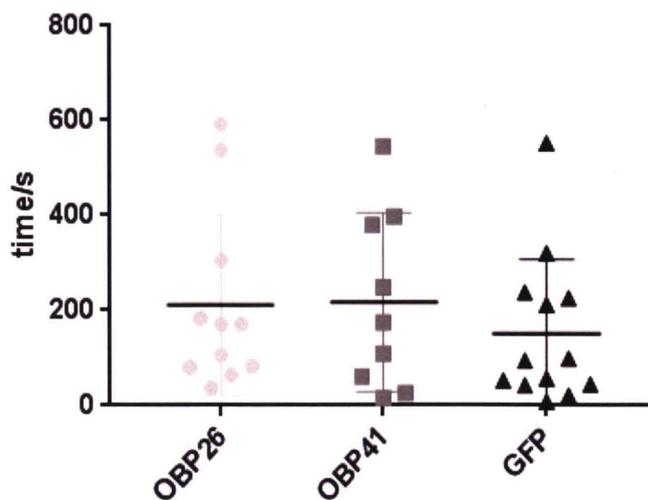


图 3.6 RNA 干扰后丽蝇蛹集金小蜂找到麻蝇蛹的时间

Figure3.6 The times of *Nasonia vitripennis* finding flesh fly pupae after RNA interference

3.3 小结与讨论

本章主要初步探究了丽蝇蛹集金小蜂触角上 OBPs 的功能。根据之前的行为学的结果，触角在寄生蜂寻找和定位寄主中具有重要作用。OBPs 作为昆虫中的重要嗅觉相关蛋白，在触角中也广泛分布，因此猜测参与寄主定位，并在其中起着重要的影响。

从定量结果看，丽蝇蛹集金小蜂的 90 个 OBPs 有 30 个是在触角中高表达的，其中还有 OBP1、OBP3、OBP18、OBP26、OBP34、OBP41、OBP43 这 7 个基因在触角的柄节和梗节部分高表达。选择两次定量结果中在触角上表达量最高的 12 个基因进行 RNA 干扰，结果只有 OBP26、OBP41 两个基因的干扰效率在 60% 以上，其他基因的干扰效率过低，未干扰成功。因此后续的实验还需对 RNA 干扰的实验设计进行改进，如引物设计、注射浓度等方面，以提高干扰效率，之后再观察以上这些 OBPs 基因在触角上的影响和作用。

观察干扰成功后的两组寄生蜂，结果证明与对照组比，寄生蜂的触角形态均无明显差异，可能是因为 OBPs 是淋巴液中的可溶性小分子蛋白，对触角的整体结构影响不大，因此无明显形态变化。而行为学实验证明，注射 GFP 的寄生蜂和 RNA 干扰后的两组寄生蜂在寄主定位方面的差异不显著，可能是因为干扰效率还不够，以至于无表型差异；也可能是因为 OBP26、OBP41 两个基因在丽蝇蛹集金小蜂的寄主定位中并不是处于重要地位甚至并不参与寄主定位，因此干扰后对寻找寄主蛹的行为影响不大。

由于触角中并不是只有一种 OBPs 存在，寄生蜂的寄主定位可能是由多种 OBPs 甚至是多种蛋白，如 CSP、ORs 等联合发挥作用，因此单独对某一个 OBPs 基因进行 RNA 干扰并不能对整个寄主定位的环节产生很大影响。后续可以通过对多个 OBPs 基因甚至是多种嗅觉相关蛋白的基因进行 RNA 干扰，探究在寄生蜂寄主定位中的相关基因和蛋白。

总结

本文通过行为学实验明确了丽蝇蛹集金小蜂对麻蝇蛹、家蝇蛹、黑腹果蝇蛹 3 种不同蝇蛹的偏好性,表明寄生蜂更为喜欢麻蝇蛹,其次是家蝇蛹,最后对黑腹果蝇蛹的选择性最低。这与之前张忠等人的研究结果相符合。之后以麻蝇蛹为寄主,探究寄生蜂触角切除后的寄生行为变化。结果表明在触角完全切除后,寄生蜂寻找寄主的效率大大降低;而仅切除部分触角后,寄生蜂寻找寄主的效率反而上升了,这里猜测可能是视觉感知在发挥补偿作用或者定位寄主的主要功能区域在寄生蜂触角基部。

丽蝇蛹集金小蜂含有 90 个 OBP 基因,广泛分布于身体的淋巴液中。用定量 PCR 确定在触角中高表达的 OBP 基因,选择其中 12 个基因进行 RNA 干扰,仅有 OBP26、OBP41 两个基因的干扰效率在 60% 以上,其他基因则未干扰成功。研究 OBP26、OBP41 两个基因干扰后的寄生蜂表型差异,结果表明在寄主寻找和定位等方面与对照组没有显著差异。可能是因为干扰效率还是太低,不能显著影响寄生蜂的寄主定位功能;或者是因为 OBP26、OBP41 这两个基因并不参与寄主定位;还猜测可能是因为这一识别和定位的过程由多种基因共同调节,单独干扰一个基因对整体影响不大。后续实验还需进行以验证上述猜想。

1. 论文的创新之处

- (1) 运用行为学实验发现寄生蜂触角前端切除后更有利于寄主定位;
- (2) 实验结果发现 RNA 干扰效率在 60% 左右不影响 OBP 在触角中的作用。

2. 论文的不足之处

- (1) RNA 干扰效率过低,选择的 OBP 基因没有干扰成功;
- (2) 还未找到在丽蝇蛹集金小蜂选择寄主过程中起作用的 OBP。

3. 后续的实验计划

- (1) 改进 RNA 干扰实验条件,提升干扰效率;
- (2) 一次性选择多个基因同时进行 RNA 干扰,观察表型变化;
- (3) 探究蝇蛹中引起寄生蜂寄生行为的主要化合物。

参考文献

- Benton, R., 2007. Sensitivity and specificity in *Drosophila* pheromone perception. *Trends in Neurosciences*, 0 (10): 512-9.
- Benton, R., K. S. Vannice, C. Gomez-Diaz, L. B. Vosshall, 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 36 (1): 149-62.
- Brito, N. F., M. F. Moreira, A. C. Melo, 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *Journal of Insect Physiology*, 95: 51-65.
- Calvello, M., A. Brandazza, A. Navarrini, F. R. Dani, S. Turillazzi, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (4): 297-307.
- Cardinale, B. J., C. T. Harvey, K. Gross, A. R. Ives, 2003. Biodiversity and biocontrol: emergent impacts of a multi-enemy assemblage on pest suppression and crop yield in an agroecosystem. *Ecology Letters*, (9): 857-865.
- Chirault, M., C. Bressac, M. Goubault, C. Lecureuil, 2018. Sperm limitation affects sex allocation in a parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Science*, 00: 1-10.
- Chirault, M., C. Lucas, M. Goubault, C. Chevrier, C. Bressac, 2015. A combined approach to heat stress effect on male fertility in *Nasonia vitripennis*: from the physiological consequences on spermatogenesis to the reproductive adjustment of females mated with stressed males. *PLoS One*, 10 (3): e0120656.
- Colazza, S., G. Aquila, C. De Pasquale, E. Peri, J. G. Millar, 2007. The egg parasitoid *Trissolcus basalus* uses n-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezaraviridula*, to discriminate between female and male hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 33 (7): 1405-1420.
- Consoli, F. L., E. W. Kitajima, J. R. Parra, 1999. Sensilla on the antenna and ovipositor of the parasitic wasps *Trichogramma galloi* Zucchi and *T. pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Microscopy Research and Technique*, 45 (4-5): 313-24.
- Cordaux, R., A. Michel-Salzat, M. Frelon-Raimond, T. Rigaud, D. Bouchon, 2004. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*, 93 (1): 78-84.
- Danneels, E. L., E. M. Formesyn, D. C. de Graaf, 2015. Exploring the potential of

- venom from *Nasonia vitripennis* as therapeutic agent with high-throughput screening tools. *Toxins (Basel)*, 7 (6): 2051-70.
- De Bruyne, M., T. C. Baker, 2008. Odor detection in insects: volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34 (7): 882-97.
- De Jesús, A. J., A. R. Olsen, J. R. Bryce, R. C. Whiting, 2004. Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *International Journal of Food Microbiology*, 93 (2): 259-262.
- Fan, J., F. Francis, Y. Liu, J. L. Chen, D. F. Cheng, 2011. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genetics and Molecular Research*, 10 (4): 3056-69.
- Fasanella, A., S. Scasciamacchia, G. Garofolo, A. Giangaspero, E. Tarsitano, 2010. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS One*, 5 (8): e12219.
- Field, L. M., J. A. Pickett, L. J. Wadhams, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology*, 9 (6): 545-51.
- Fleischer, J., P. Pregitzer, H. Breer, J. Krieger, 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75 (3): 485-508.
- Fotedar, R., 2001. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. *Acta Tropica*, 78 (1): 31-4.
- Gu, S., J. Zhou, G. Wang, Y. Zhang, Y. Guo, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43 (3): 237-251.
- Hallem, E. A., A. Dahanukar, J. R. Carlson, 2006. Insect odor and taste receptors. *Annual Review of Entomology*, 51: 113-35.
- Hekmat-Scafe, D. S., C. R. Scafe, A. J. McKinney, M. A. Tanouye, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12 (9): 1357-69.
- Holldobler, B., E. O. Wilson, 1977. Colony-specific territorial pheromone in the African weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille). *PNAS*, 74 (5): 2072-5.
- Holt, P. S., C. J. Geden, R. W. Moore, R. K. Gast, 2007. Isolation of salmonella enterica serovar enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms

- containing salmonella serovar enteritidis-challenged hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19): 6030-6035.
- Ishida, Y., J. Ishibashi, W. S. Leal, 2013. Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. *PLoS One*, 8 (1): e51779.
- Jacquin-Joly, E., C. Merlin, 2004. Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (12): 2359-97.
- Katsuda, Y., 2012. Progress and future of pyrethroids. *Topics in Current Chemistry*, 314: 1-30.
- Kerr, J. L., D. Kelly, M. K. Bader, E. G. Brockerhoff, 2017. Olfactory cues, visual cues, and semiochemical diversity interact during host location by invasive forest beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 43 (1): 17-25.
- Krieger, J., H. Ganssle, K. Raming, H. Breer, 1993. Odorant binding proteins of *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (4): 449-56.
- Leal, W. S., 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373-91.
- Li, J., N. Wang, Y. Liu, S. Qiu, 2018. Proteomics of *Nasonia vitripennis* and the effects of native *Wolbachia* infection on *N. vitripennis*. *Peer J*, 6: e4905.
- Li, M., M. Bui, O. S. Akbari, 2017. Embryo microinjection and transplantation technique for *Nasonia vitripennis* genome manipulation. *Journal of Visualized Experiments*, (130).
- Li, S., J. Picimbon, S. Ji, Y. Kan, Q. Chuanling, 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372 (3): 464-468.
- Martinson, E. O., J. H. Werren, 2018. Venom is beneficial but not essential for development and survival of *Nasonia*. *Ecological Entomology*, 43 (2): 146-153.
- Martinson, E. O., D. Wheeler, J. Wright, Mrinalini, A. L. Siebert, 2014. *Nasonia vitripennis* venom causes targeted gene expression changes in its fly host. *Molecular Ecology*, 23 (23): 5918-30.
- Masry, A., J. P. Cunningham, A. R. Clarke, 2018. From laboratory to the field: consistent effects of experience on host location by the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Science*, 00:1-10.
- Montell, C., 2009. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors Craig Montell^{1,2}. *Current Opinion in Neurobiology*, 19 (1): 345-353.

- Nielsen, A. A., H. Skovgard, A. Stockmarr, K. J. Handberg, P. H. Jorgensen, 2011. Persistence of low-pathogenic avian influenza H5N7 and H7N1 subtypes in house flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 48 (3): 608-14.
- Paula, D. P., R. C. Togawa, C. C. M. Do, P. Grynberg, N. F. Martins, 2018. Systemic and sex-biased regulation of OBP expression under semiochemical stimuli. *Scientific Reports*, 8 (1): 6035.
- Pelosi, P., J. J. Zhou, L. P. Ban, M. Calvello, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (14): 1658-76.
- Peng, G., W. S. Leal, 2001. Identification and cloning of a pheromone-binding protein from the Oriental beetle, *Exomala orientalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 27 (11): 2183-92.
- Pregitzer, P., M. Greschista, H. Breer, J. Krieger, 2014. The sensory neurone membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system. *Insect Molecular Biology*, 23 (6): 733-742.
- Qian, C., D. Liang, Y. Liu, P. Wang, S. Kausar, 2017. Identification of a small pacifastin protease inhibitor from *Nasonia vitripennis* venom that inhibits humoral immunity of host (*Musca domestica*). *Toxicon*, 131: 54-62.
- Quilici, S., P. Rousse, 2012. Location of host and host habitat by fruit fly parasitoids. *Insects*, 3 (4): 1220-35.
- Rivers, D. B., F. Uckan, E. Ergin, 2006. Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61 (1): 24-41.
- Robertson, H. M., J. Gadau, K. W. Wanner, 2010. The insect chemoreceptor superfamily of the parasitoid jewel wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19: 121-136.
- Rosi, M. C., N. Isidoro, S. Colazza, F. Bin, 2001. Source of the host marking pheromone in the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Insect Physiology*, 47 (9): 989-995.
- Rutzler, M., L. J. Zwiebel, 2005. Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models. *Journal of Comparative Physiology*, 191 (9): 777-90.
- Rybczynski, R., R. G. Vogt, M. R. Lerner, 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus*

- and *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (32): 19712-5.
- Sakurai, T., S. Namiki, R. Kanzaki, 2014. Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkworm *Bombyx mori*. *Frontiers in Physiology*, 5: 125.
- Sato, K., K. Touhara, 2009. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 47: 121-38.
- Schmittgen, T. D., K. J. Livak, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101-8.
- Shao-Hua, G., Z. Jing-Jiang, W. Gui-Rong, G. Yu-Yuan, Z. Yong-Jun, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. Nanjing, Jiangsu, China: 2.
- Shropshire, J. D., E. J. van Opstal, S. R. Bordenstein, 2016. An optimized approach to germ-free rearing in the jewel wasp *Nasonia*. *PeerJ*, 4: e2316.
- Shuker, D., J. Lynch, A. Peire Morais, 2003. Moving from model to non-model organisms? Lessons from *Nasonia* wasps. *BioEssays*, 25 (12): 1247-1248.
- Silva, C. C. A., G. de Capdeville, M. C. B. Moraes, R. Falcão, L. F. Solino, 2010. Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron*, 41 (4): 289-300.
- Sim, A. D., D. Wheeler, 2016. The venom gland transcriptome of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* highlights the importance of novel genes in venom function. *BMC Genomics*, 17: 571.
- Steidle, J. L. M., V. J. J. A. Loon, 2003. Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 108 (3): 133-148.
- Sun, H., Y. Song, J. Du, X. Wang, Z. Cheng, 2016. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Athetis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 51 (3): 409-420.
- Sun, Y. L., L. Q. Huang, P. Pelosi, C. Z. Wang, 2012. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. *PLoS One*, 7 (1): e30040.
- van Giesen, L., P. A. Garrity, 2017. More than meets the IR: the expanding roles of variant Ionotropic Glutamate Receptors in sensing odor, taste, temperature and moisture. *F1000Res*, 6: 1753.

- Vieira, F. G., S. Forêt, X. He, J. Rozas, L. M. Field, 2012. Unique features of odorant-binding proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* revealed by genome annotation and comparative analyses. *PLoS One*, 7 (8): e43034.
- Vogt, R. G., L. M. Riddiford, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293 (5828): 161-3.
- Wang, L., J. Y. Zhu, C. Qian, Q. Fang, G. Y. Ye, 2015. Venom of the parasitoid wasp *Pteromalus puparum* contains an odorant binding protein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88 (2): 101-10.
- Wanner, K. W., L. G. Willis, D. A. Theilmann, M. B. Isman, Q. Feng, 2004. Analysis of the insect os-d-like gene family. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (5): 889-911.
- Wei, T., J. Hu, K. Miyanaga, Y. Tanji, 2013. Comparative analysis of bacterial community and antibiotic-resistant strains in different developmental stages of the housefly (*Musca domestica*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (4): 1775-1783.
- Werren, J. H., D. W. Loehlin, 2009. Curing *Wolbachia* infections in *Nasonia* (parasitoid wasp). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009 (10): 5312.
- Werren, J. H., S. Richards, C. A. Desjardins, O. Niehuis, J. Gadau, 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 327 (5963): 343-8.
- Wolfling, M., M. Rostas, 2009. Parasitoids use chemical footprints to track down caterpillars. *Communicative & Integrative Biology*, 2 (4): 353-5.
- Wurm, Y., L. Keller, 2010. Parasitoid wasps: from natural history to genomic studies. *Current Biology*, 20 (5): R242-4.
- Xu, P. X., L. J. Zwiebel, D. P. Smith, 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 12 (6): 549-60.
- Xu, Y. L., P. He, L. Zhang, S. Q. Fang, S. L. Dong, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics*, 10: 632.
- Yan, X., C. Deng, J. Xie, L. Wu, X. Sun, 2017. Distribution patterns and morphology of sensilla on the antennae of *Plutella xylostella* (L.)—A scanning and transmission electron microscopic study. *Micron*, 103: 1-11.
- Yin, J., C. Wang, C. Fang, S. Zhang, Y. Cao, 2019. Functional characterization of

- odorant-binding proteins from the scarab beetle *Holotrichia oblita* based on semiochemical-induced expression alteration and gene silencing. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 104: 11-19.
- Zhang, H., K. Zhang ,X. Hong, 2010. Population dynamics of noncytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* in *Nilaparvata lugens* and its effects on host adult life span and female fitness. *Environmental Entomology*,39 (6): 1801-1809.
- Zhang, R., B. Wang, G. Grossi, P. Falabella ,Y. Liu, 2017. Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids. *Current Biology*, 27 (1): 55-61.
- Zhang, S., Z. Zhang, X. Kong, H. Wang ,G. Zhou, 2012. External morphology of *Trichogramma dendrolimi* Matsumura (Hymenoptera: Trichogrammatidae) organ and ultrastructure of the sensilla. *Microscopy Research and Technique*, 75 (11): 1513-1521.
- Zhang, Y., Y. Wang, C. Liu, J. Wang ,G. Hu, 2019. Development of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) at constant temperatures in China. *Journal of Medical Entomology*, 56 (2): 368-377.
- Zheng, Z. C., D. Z. Li, A. Zhou, S. C. Yi ,H. Liu, 2016. Predicted structure of a Minus-C OBP from *Batocera horsfieldi* (Hope) suggests an intermediate structure in evolution of OBPs. *Scientific Reports*, 6: 33981.
- Zhou, J. J., 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitamins and Hormones*, 83: 241-72.
- Zhou, J. J., F. G. Vieira, X. L. He, C. Smadja ,R. Liu, 2010. Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, 19: 113-122.
- Zwiebel, L. J. ,W. Takken, 2004. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (7): 645-652.
- 白树雄, 王振营, 何康来, 文丽萍, 周大荣, 2004. 玉米螟赤眼蜂对亚洲玉米螟益它素的嗅觉反应. *昆虫学报*, (01): 48-54.
- 迟克强, 孙亚飞, 孙守慧, 宋丽文, 孙晓玲, 2004. 昆虫化学信息物质概述. *吉林林业科技*, (05): 27-30.
- 韩文素, 张树发, 沈福英, 苑士涛, 张红杰, 2010. 寄生蜂产卵引诱物的研究概述. *中国植保导刊*, 30 (9): 16-21.
- 黄寿山, 吴伟坚, 李长友, 2000. 存在植物、害虫、天敌之间的他感物质及其功能. *生态科学*, (04): 23-34.

- 姜勇, 雷朝亮, 张钟宁, 2002. 昆虫聚集信息素. 昆虫学报, (06): 822-832.
- 冷培恩, 王明福, 莫建初, 张忠, 邱星辉, 2015. 蝇类防制工作进展与发展展望. 中国媒介生物学及控制杂志, 26 (03): 217-222+227.
- 李玉利, 张永军, 赵奎军, 陆宴辉, 吴孔明, 2009. 寄生蜂寄主选择的化学信息调控. 植物保护, 35 (03): 7-11.
- 马瑞燕, 2000. 昆虫的触角感器. 昆虫知识, 3 (37): 179-183.
- 莫建初, 王成盼, 尉吉乾, 2019. 昆虫外周嗅觉系统研究进展. 江西农业大学学报, 41 (01): 50-57.
- 任炳忠, 雒雯琦, 张雪, 王寅亮, 2017. 昆虫嗅觉通讯研究概述与展望. 吉林农业大学学报, 39 (03): 253-261.
- 王安佳, 张开心, 梅向东, 高玉林, 张涛, 2018. 昆虫性信息素及其类似物干扰昆虫行为的机理和应用研究进展. 农药学学报, 20 (04): 425-438.
- 许维岸, 李照会, 叶保华, 2000. 化学信息素在寄生蜂寄主选择行为中的调控作用. 山东农业大学学报(自然科学版), (03): 320-324.
- 薛瑞德, 陈仁兵, 张杰, 张文忠, 肖蔼祥, 1988. 丽蝇蛹集金小蜂的大量繁殖与释放方法. 昆虫知识, 25 (1): 53-54.
- 薛瑞德, 张文忠, 肖蔼祥, 陈仁兵, 张杰, 1987. 丽蝇蛹集金小蜂的微生态环境及其对个体发育的影响. 生物学杂志, (05): 10-13+8.
- 张焘, 张忠, 李凯, 叶恭银, 胡萃, 2005. 丽蝇蛹集金小蜂寄生棕尾别麻蝇的生理学效应. 浙江大学学报(农业与生命科学版), (01): 74-78.
- 张艳凯, 张开军, 谢蓉蓉, 赵冬晓, 洪晓月, 2015. 共生菌Wolbachia引起宿主细胞质不亲和的研究进展. 昆虫学报, 58 (12): 1344-1355.
- 张瑜, 张胜男, 张媛媛, 刘志韬, 孙朝辉, 2016. 昆虫嗅觉机制的研究进展. 福建农业学报, 5 (31): 538-544.
- 张治科, 张焘, 吴圣勇, 雷钟仁, 2017. 昆虫气味结合蛋白研究进展. 环境昆虫学报, 3 (39): 713-720.
- 张忠, 史卫峰, 叶恭银, 胡萃, 于爱莲, 2008. 丽蝇蛹集金小蜂雌蜂的寄主选择性. 中国病原生物学杂志, (11): 818-820.
- 张忠, 史卫峰, 叶恭银, 胡萃, 于爱莲, 2008. 丽蝇蛹集金小蜂的寄生习性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 19 (06): 507-509.

- 张忠, 史卫峰, 叶恭银, 胡萃, 于爱莲, 2008. 丽蝇蛹集金小蜂的寄生习性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 19 (06): 507-509.
- 赵红霞, 曾鑫年, 梁勤, 张学锋, 黄文忠, 2015. 蜜蜂气味结合蛋白的生化特性、系统进化、表达部位和生理功能的研究. 环境昆虫学报, 37 (02): 420-425.

附录一 丽蝇蛹集金小蜂触角传感器的扫描电镜图

应用扫描电镜技术对丽蝇蛹集金小蜂雌虫触角上的传感器形态进行观察,结果表明雌蜂触角上的传感器类型主要为刺形传感器、毛形传感器、伯母氏鬃、板型传感器、薄壁化学传感器、厚壁化学传感器、锥形乳状传感器、钟形传感器等。

1.1 材料与方 法

样品制作及观察方法:

- (1) 选择羽化后 24h 内的丽蝇蛹集金小蜂雌虫,用 3%戊二醛固定 3 h 后,在体视显微镜下用解剖针取下触角;
- (2) 解剖好的样品用蒸馏水清洗 3—4 次后,放入超声波清洗器处理 2 min;
- (3) 依次用浓度为 10%、30%、50%、70%、80%、90%、95%的乙醇溶液清洗一次,无水乙醇进行脱水处理两次;每次处理时间均为 10 min;
- (4) 自然干燥后,置于样品台上,固定、喷金;
- (5) 用扫描电镜进行触角表面超微结构的观察。

1.2 结果与分析

丽蝇蛹集金小蜂的触角呈膝状,长约 0.5 mm~0.7 mm,可分为三部分:柄节 (Scape)、梗节 (Pedicel) 和鞭节 (Flagellum),而鞭节部分可细分为环节 (Ring segment)、索节 (Club) 和棒节 (Funicle)。柄节是连接触角和寄生蜂的头部,较粗,长度约占触角的 1/3;梗节为锥状;环节 2 节,较为细小;索节末端愈合形成棒节,但膨大并不明显 (图 1.1 A)。在丽蝇蛹集金小蜂的触角上遍布着不同类型的嗅觉传感器,在寻找寄主、配偶、栖息地、食物等多个方面起着重要的作用。

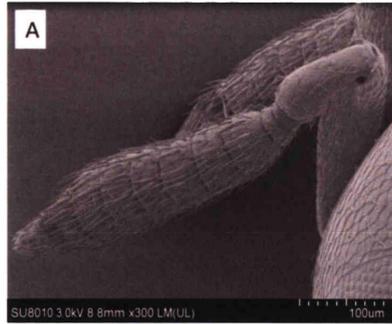


图 1.1 丽蝇蛹集金小蜂触角形态

Figure 1.1 Shape of antenna of *Nasonia vitripennis*

1.2.1 丽蝇蛹集金小蜂触角上感器类型

刺形感器 (sensilla chaetica, SC): 分布最为广泛且数量最多, 在触角的各节均有发现。刺形感器长短不一, 在 15~27 μm 左右, 整体形态为细长且挺直的毛状感器, 表面具有纵向条纹, 具有基节窝, 与触角表面呈锐角 (图 1.2-B)。

毛形感器 (sensilla trichodea, ST): 仅存在于触角端部, 为弯曲而细长的毛状结构, 基部有突起的组织, 在顶端排列成一圈 (图 1.2-D)。

伯母氏鬃 (Böhm bristles, BB): 在触角基节以及梗节的基部存在。较短, 整体呈锥形, 感器表面光滑, 垂直生长于触角表面的凹状窝内 (图 1.2-A)。

板型感器 (sensilla placodea, SP): 分布于触角的索节与棒节中, 整体为宽厚的板状结构, 基部与触角表面融合, 顶端较为尖细, 似房檐一般伸出。相邻两个板型感器的生长位置不在同一水平线, 而是“前—后—前”交错排列 (图 1.2-C)。

薄壁化学感器 (thin walled chemoreceptor, TNC): 分布于触角的索节与棒节中, 类似刺形感器, 但比刺形感器长, 在 25~30 μm 左右, 且基部没有基节窝, 表面光滑, 整体平行于触角表面 (图 1.2-C)。

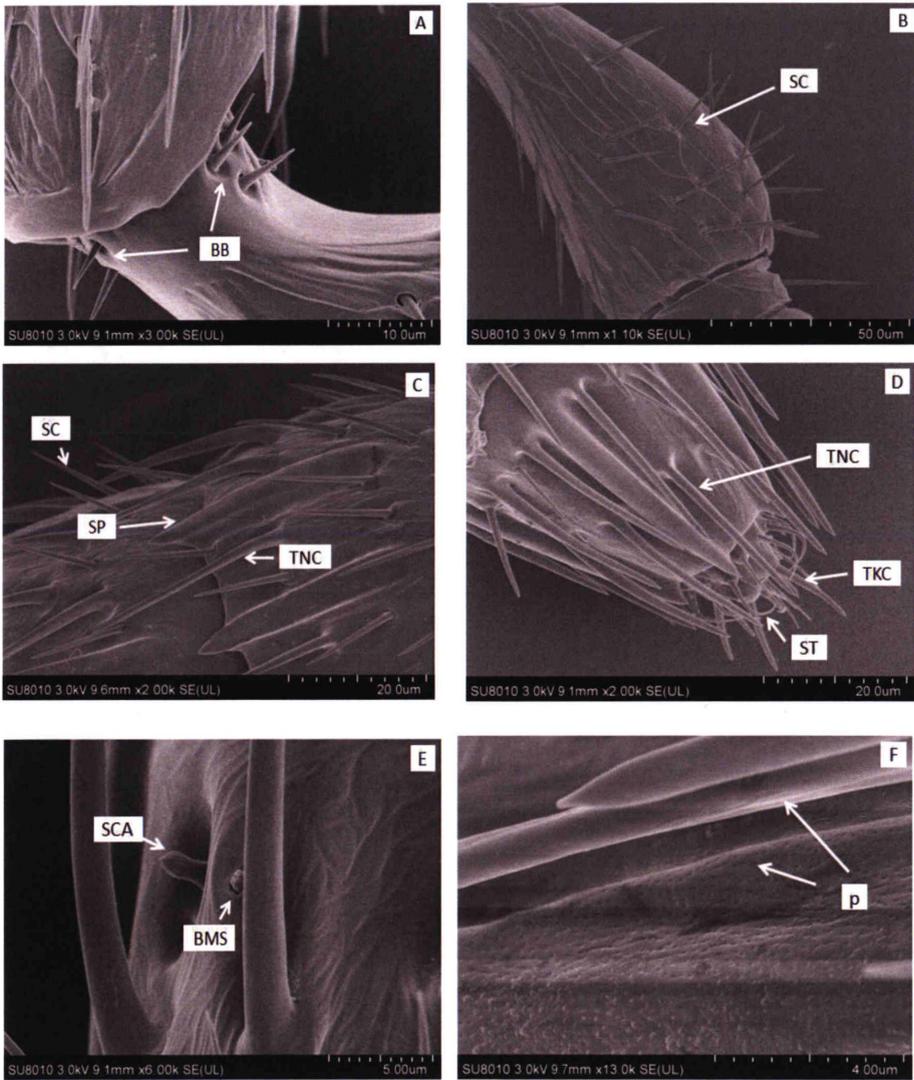
厚壁化学感器 (thick walled chemoreceptor, TKC): 分布于触角端部, 为短而粗的毛状结构, 表面光滑 (图 1.2-D)。

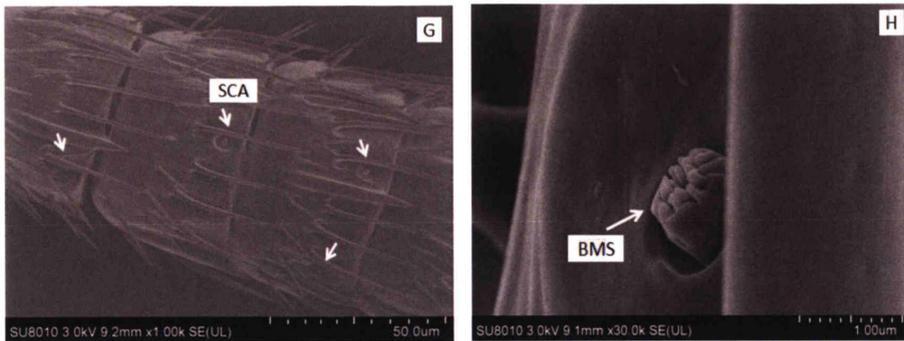
锥形乳状感器 (basiconic mastoid sensilla, BMS): 数量最少, 仅在触角索节部位发现。生长与触角表面的凹状窝内, 中央的锥形突起顶部有花瓣状结构 (图 1.2-E)。

钟形感器 (sensilla campaniformia, SCA): 分布于触角索节及鞭节部位, 形

态奇特，触角表面有凹陷的圆盘，基部有一圈光滑的厚壁组织，中间具有锥形凸起，顶部具有纵向条纹。在触角上分布不均，多为单个存在，每个亚节中有 2-5 个左右（图 1.2-E、G）。

除以上感器结构外，触角表面及感器表面分布有许多微孔结构（图 1.2-F）。





BB: 伯母氏鬃; SC: 刺形感器; SP: 板型感器; TNC: 薄壁化学感器; TKC: 厚壁化学感器; ST: 毛形感器; SCA: 钟形感器; BMS: 锥形乳状感器; p: 微孔; G: 钟形感器俯视图

图 1.2 丽蝇蛹集金小蜂的触角感器

Figure 1.2 Antenna sensilla of *Nasonia vitripennis*

附录二 丽蝇蛹集金小蜂 90 个 OBPs 在不同转录组中的表达量

Tracking id	Locus	Length	NvCarca ssWoVen om_FPK M	NvEmbr yo_FPK M	NvFemal Adult_F PKM	NvFemal ePupa_F PKM	NvLarva e_FPKM	NvLarva ISG_FP KM	NvMale Adult_F PKM	NvMale Pupae_F PKM	NvOvary _FPKM	NvVeno m_FPK M
NvitOBP01	SCAFFOL D1:3216953 -3217898	606	896.277	52.0749	3996.07	129.102	100.021	184.337	1081.09	71.6327	332.617	107.579
NvitOBP02	SCAFFOL D1:3218878 -3222299	888	1117.45	3147.39	925.609	2775.57	1077.2	3794.4	614.497	2693.54	6432.48	3079.31
NvitOBP03	SCAFFOL D1:5526198 -5527235	597	650.563	69.6434	11854.3	27.0265	114.014	0	3075.82	294.03	260.256	1908.29
NvitOBP04	SCAFFOL D3:3129541 -3130288	393	12.5776	2623.93	26.9294	456.311	2422.56	10429.9	41.0228	159.863	869.902	0
NvitOBP05	SCAFFOL D3:5090236 -5090590	354	4.8996	0	0	23.7571	0	0	0	0	0	0
NvitOBP06	SCAFFOL D5:3002215 -3003071	578	59.7751	0	219.614	0	12.0997	0	85.2152	18.3576	0	7330.65
NvitOBP07	SCAFFOL	601	1584.49	34.0149	722.946	32.1286	48.2039	284.9	486.588	52.288	42.6029	708.312

	D9:303691-304580											
NvitOBP08	SCAFFOL D9:304962-305957	647	2175.3	19.1568	2511.52	8.16188	0	0	787.746	7.31446	45.6958	11897.9
NvitOBP09	SCAFFOL D9:337139-337919	542	1463.71	427.867	1710.55	54147.1	78124	221271	365.594	45528.2	416.251	94170.1
NvitOBP10	SCAFFOL D9:371372-372144	411	44.5775	0	149.267	0	461.708	118.733	60.1797	15.9524	0	266.529
NvitOBP11	SCAFFOL D9:372583-373862	767	538.633	0	1442.04	26.0212	27.1021	45.5597	210.258	323.29	10.5751	674.641
NvitOBP12	SCAFFOL D9:374055-374973	702	375.765	0	924.984	0	44.0727	205.552	279.486	0	14.1935	0
NvitOBP13	SCAFFOL D9:375121-376232	630	124.781	24.0244	949.156	6.94397	543.186	199.95	242.547	109.216	15.7786	903.312
NvitOBP14	SCAFFOL D9:376601-377294	405	0	0	24.3285	0	0	0	25.1969	0	0	0
NvitOBP15	SCAFFOL D9:377982-378858	586	120.291	55.1	30.562	413.819	9154.13	4958.02	48.4434	121.172	0	86.4003

NvitOBP16	SCAFFOL D9:379092- 379947	519	43.4032	0	358.776	1530.24	814.453	174.773	92.4112	1368.93	0	0
NvitOBP17	SCAFFOL D9:380017- 380875	564	378.24	70.5493	924.437	10.8862	95.7944	115.93	372.166	9.35613	0	1043.24
NvitOBP18	SCAFFOL D9:382788- 383652	612	5796.35	923.289	8318.77	8334.46	483.416	193269	2682.57	7250.65	502.369	1557.09
NvitOBP19	SCAFFOL D9:384452- 386026	1121	8.86133	78.2736	13.7946	21.9163	8.76809	32.5153	5.35804	13.3572	0	35044.5
NvitOBP20	SCAFFOL D9:390604- 391832	870	130.406	62.0656	24.5466	62.7292	12.6727	79.4488	122.981	51.2738	51.7758	3538.92
NvitOBP21	SCAFFOL D9:391918- 392915	485	79.7968	87.0858	16.1047	3724.44	11971.4	10090.6	231.999	1799.7	0	3538.18
NvitOBP22	SCAFFOL D9:393480- 394434	411	4.08346	314.458	9.16671	89.9988	0	0	10.3597	78.9614	0	163.89
NvitOBP23	SCAFFOL D9:394878- 396150	819	0	0	0.73855	80.391	0	0	0.76973	54.2461	0	0
NvitOBP24	SCAFFOL D9:396342-	471	85.4496	0	33.9633	911.273	32.813	99.6072	361.357	486.518	0	0

	397244											
NvitOBP25	SCAFFOL D9:397727- 399413	556	4.66331	0	0	10483.1	0	0	1.35803	7199.63	0	0
NvitOBP26	SCAFFOL D9:400406- 401945	612	23864.3	0	24148	18117.4	584.439	1700.7	12403	27826.1	2588.45	67420.6
NvitOBP27	SCAFFOL D9:402204- 403434	775	51.8636	0	33.3514	6117.69	55.6825	791.607	35.4617	3931.54	14.9978	1.8752
NvitOBP28	SCAFFOL D9:450303- 451122	535	3522.27	0	6111.77	20226.8	6325.85	8703.94	2666.42	12901.1	160.296	2008.35
NvitOBP29	SCAFFOL D9:454017- 454691	465	70.032	0	34.1228	96.6627	10272	4662.16	74.224	75.9381	0	112.589
NvitOBP30	SCAFFOL D9:455353- 456292	551	344.531	544.262	558.751	1430.82	731.158	442.744	733.589	1074	4770.15	235.607
NvitOBP31	SCAFFOL D9:1988740 -1989483	402	42.0308	0	39.4004	0	0	0	19.893	19.2863	0	0
NvitOBP32	SCAFFOL D9:1990156 -1991140	698	1183.11	236.352	2934.79	34.8117	0	0	1929.43	35.3295	120.428	1132.87
NvitOBP33	SCAFFOL	851	67.5712	138.198	43.7288	10.0355	7.78861	14.8703	14.1191	6.16398	9.79047	133.842

	D9:1991244 -1994875											
NvitOBP34	SCAFFOL D9:1991244 -1994875	1104	300.988	133.288	965.24	17.4833	15.8382	0	228.459	12.6326	0	925.428
NvitOBP35	SCAFFOL D9:1991244 -1994875	598	3686.27	2457.55	4860.52	58.3239	38.9298	35.6611	1669.77	59.9138	383.273	462.528
NvitOBP36	SCAFFOL D9:1995157 -1995880	429	83.7574	0	175.028	0	0	0	66.1632	0	0	0
NvitOBP37	SCAFFOL D9:1996189 -1997147	627	2375.41	105.665	4359.31	0	17.1975	0	873.528	0	75.1314	888.502
NvitOBP38	SCAFFOL D9:1997725 -1999183	873	1579.69	33.4979	2621.1	5.79517	9.04907	200.574	767.64	0	141.607	7407.71
NvitOBP39	SCAFFOL D9:1999481 -2000880	798	632.7	0	1018.59	35.7722	43.858	97.7793	461.901	9.94228	72.617	12630.3
NvitOBP40	SCAFFOL D9:2001487 -2003036	950	3391.46	66.1392	8289.7	17.788	0	0	3146.26	19.0602	167.34	478.401
NvitOBP41	SCAFFOL D9:2003329 -2005021	998	778.63	31.5102	2137.12	4.46285	0	0	871.811	7.19373	158.076	3280.36

NvitOBP42	SCAFFOL D9:2005216 -2007063	774	7.30217	0	24.0665	0	0	0	2.80762	0	0	0
NvitOBP43	SCAFFOL D9:2007440 -2008759	576	532.129	0	224.584	8.83325	12.8907	0	49.1055	0	19.9878	335.626
NvitOBP44	SCAFFOL D9:2009097 -2010665	963	858.26	0	1408.34	20.7813	6.1324	0	469.551	0	102.003	8283.31
NvitOBP45	SCAFFOL D9:2011079 -2012790	1004	1533.75	0	9343.38	4.2577	0	0	1588.19	0	66.0409	1008.79
NvitOBP46	SCAFFOL D9:2013804 -2015579	1175	7367.07	0	12228.6	14.9846	15.6246	21.4872	3175.33	15.9803	440.475	9132.93
NvitOBP47	SCAFFOL D9:2015770 -2016761	689	1196.92	0	1983.92	47.9438	0	0	620.707	27.7063	166.65	8541.62
NvitOBP48	SCAFFOL D9:2017557 -2018988	780	2340.14	44.8579	8739.76	24.2806	0	0	2474.83	10.5373	58.0198	1603.51
NvitOBP49	SCAFFOL D9:2020400 -2021422	706	317.056	0	126.002	39.7016	98.2246	37.0426	294.16	46.7186	30.0357	41.6759
NvitOBP50	SCAFFOL D9:2021695	713	1049.12	0	970.293	55.022	0	0	349.892	15.6492	134.333	8865.14

	-2022689											
NvitOBP51	SCAFFOL D9:2023817 -2025792	954	445.024	38.2965	2192.81	29.8593	2.21554	0	679.968	12.5137	9.26991	675.645
NvitOBP52	SCAFFOL D9:2023817 -2025792	628	124.489	0	368.074	34.1312	0	0	121.222	520.086	0	1297.64
NvitOBP53	SCAFFOL D9:2025990 -2027300	737	341.366	35.91	433.961	2541.54	5.73655	13.8584	168.298	1766.14	12.8335	127.269
NvitOBP54	SCAFFOL D9:2027505 -2029587	682	17.174	0	55.8375	1602.85	2620.41	2947.67	21.2381	868.788	0	0
NvitOBP55	SCAFFOL D9:2027505 -2029587	707	1645.97	255.744	2416.22	4112.03	347.976	2603.5	662.81	3090.08	204.862	34578.6
NvitOBP56	SCAFFOL D9:2439444 -2440275	552	4.51707	33.7491	1.08649	2862.31	7680.32	64315.5	11.0181	757.468	211.947	0
NvitOBP57	SCAFFOL D9:2440882 -2441292	315	0	0	0	0	0	68.0022	0	0	0	0
NvitOBP58	SCAFFOL D9:2445020 -2446194	666	276.094	42.2667	222.137	656.553	83866.8	12452.4	214.668	300.012	0	275.273
NvitOBP59	SCAFFOL	587	2156.19	0	177.301	605.251	1158.18	826.204	121.893	317.966	19.4848	1069.71

	D9:2446925 -2447816											
NvitOBP60	SCAFFOL D9:2448144 -2449280	734	639.262	12.3602	440.245	18304.9	7974.08	36721.8	483.441	7095.6	64.3114	1062.75
NvitOBP61	SCAFFOL D9:2449414 -2450289	560	486.845	102.799	1813.48	2131.44	431.053	4757.3	768.499	927.885	196.953	164.954
NvitOBP62	SCAFFOL D9:2451560 -2452607	734	838.789	79.2999	3028.91	584.558	0	145.93	641.953	58.5317	0	3637.77
NvitOBP63	SCAFFOL D9:2453745 -2454360	372	14.5141	0	10.4074	18.1161	87.3633	1707	22.9153	52.5614	0	277.143
NvitOBP64	SCAFFOL D9:3714213 -3715742	330	0	648.969	368.048	0	0	0	38.7717	0	334.894	0
NvitOBP65	SCAFFOL D18:187889 3-1880027	648	6407.94	0	2631.23	6.87189	21.3296	0	2691.41	58.7218	228.195	10481.1
NvitOBP66	SCAFFOL D18:188046 1-1881517	736	5834.78	83.337	7950.17	48.3741	6.796	0	7203.39	31.4956	3754.23	3917.81
NvitOBP67	SCAFFOL D20:168862 2-1689600	671	136.285	0	0	10.384	0	26.1619	8.90151	8.62059	76.9455	7.85078

NvitOBP68	SCAFFOL D20:169035 2-1691008	372	0	0	0	0	0	120.765	0	20.4358	116.752	131670
NvitOBP69	SCAFFOL D24:209165 1-2092446	516	29408.6	0	13569.1	12.1977	541.012	38.2017	8634.88	45.8861	2445.63	2.10E+ 06
NvitOBP70	SCAFFOL D30:211840 -212766	438	4.54837	0	0	0	32.9375	34.0791	0	0	0	0
NvitOBP71	SCAFFOL D30:213224 -214598	843	53.512	77.7569	42.6859	21.7029	443.209	459.202	96.6757	0	0	2927.99
NvitOBP72	SCAFFOL D30:663110 -663736	420	6.74364	636.718	34.07	294.741	73.5561	56.6633	14.618	312.142	0	341.028
NvitOBP73	SCAFFOL D30:663876 -665256	743	31.0309	500.327	33.5305	436.868	178.388	329.302	33.3272	1120.24	169.52	803.432
NvitOBP74	SCAFFOL D33:144289 4-1443169	275	0	1041.51	0	0	0	0	0	0	0	0
NvitOBP75	SCAFFOL D40:131383 2-1314629	512	392.427	0	226.927	10207.3	440.276	1815.24	114.166	8421.46	44.2433	2161.94
NvitOBP76	SCAFFOL D126:11102	423	333.819	0	3861.23	169.174	0	0	1382.68	183.181	0	0

	8-111712											
NvitOBP77	SCAFFOL D153:38277 1-383579	411	12.4554	0	85.661	0	0	0	147.745	0	0	0
NvitOBP78	SCAFFOL D153:38406 3-385032	462	70.9541	0	224.713	50.7643	20.4803	0	252.953	11.5779	0	0
NvitOBP79	SCAFFOL D153:38572 1-386545	405	124.909	0	1264.94	0	1338.07	672.271	410.134	0	0	0
NvitOBP80	SCAFFOL D153:38720 2-387889	381	0	0	15.3142	0	0	0	5.1793	0	0	0
NvitOBP81	SCAFFOL D153:38825 9-389299	509	160.963	0	414.692	0	144.154	190.572	184.578	0	0	0
NvitOBP82	SCAFFOL D153:41265 9-413560	566	4430.29	200.753	6221.24	42.5171	136.166	77.0906	1545.41	26.4663	0	843.518
NvitOBP83	SCAFFOL D153:52034 7-521438	681	471.061	32.6533	870.161	0	0	0	433.582	0	0	0
NvitOBP84	SCAFFOL D153:52254 8-523934	965	208.488	13.4891	736.541	4.67701	0	0	158.479	3.31954	37.9639	0
NvitOBP85	SCAFFOL	399	0	0	0	34.2248	0	0	1.96571	0	0	0

	D163:13072 1-131563											
NvitOBP86	SCAFFOL D174:12791 3-129079	850	247.381	69.9408	494.577	5.44396	4.54698	10.3832	213.014	4.40061	41.2097	743.582
NvitOBP87	SCAFFOL D178:16560 5-166276	387	14.8042	0	53.9687	0	77.0727	136.683	31.9552	16.1923	0	0
NvitOBP88	SCAFFOL D178:16938 4-170168	402	17.5323	0	239.506	59.986	1948.07	2919.93	88.3044	16.3246	0	0
NvitOBP89	SCAFFOL D178:17075 9-171067	240	0	1348.58	0	0	0	232.616	0	0	0	0
NvitOBP90	SCAFFOL D185:67587 -68583	557	646.617	0	601.259	18.636	40.8069	105.705	826.606	117.353	1596	24633.1

作者简历

教育经历

2016年9月—2019年6月 浙江大学 攻读硕士学位 农业昆虫与害虫防治
2012年9月—2016年7月 浙江大学 攻读学士学位 植物保护

硕士期间已发表论文

- 1、 Qi YX, **Jin M**, Ni XY, Ye GY, Lee Y, Huang J, 2017. Characterization of three serotonin receptors from the small white butterfly, *Pieris rapae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 107-116.
- 2、 Mao F, Guo L, **Jin M**, Qiao XM, Ye GY, Huang J, 2019. Molecular cloning and characterization of TRPVs in two rice pests: *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Nephotettix cincticeps* (Uhler). *Pest Management Science*, 75: 1361–1369.