

浙江大学
博士学位论文
蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液的生化特性与生理功能
姓名：张忠
申请学位级别：博士
专业：农业昆虫与害虫防治
指导教师：胡萃;叶恭银
20050501

中文摘要

本论文针对国内外有关寄生蜂毒液性质与功能研究主要限于姬蜂科和茧蜂科, 而有关其它科寄生蜂研究甚少之现状, 特对隶属金小蜂科的蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液的性质和功能进行了系统研究, 主要结果概括如下:

1 蝶蛹金小蜂成蜂生殖系统抑制寄主细胞免疫因子的确定

蝶蛹金小蜂卵巢、卵子、输卵管、睾丸和雄性附腺提取物处理其寄主菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹血细胞后, 其细胞延展率、死亡率及对 Sephadex A-50 微珠的包裹率与对照相比均无显著差异; 而雌蜂毒液则可显著抑制血细胞延展及对 Sephadex A-50 微珠的包裹, 并引起血细胞的显著死亡。可见, 蝶蛹金小蜂毒液是抑制其寄主血细胞免疫的主要因子。此蜂毒液的功能显然不同于具多分 DNA 病毒 (PDV) 的茧蜂或姬蜂。

2 两种金小蜂毒器官发育动态及其与卵子发育的关系

饲以蜂蜜的蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂雌蜂发育过程中, 毒腺长度变化不大, 毒囊变化明显, 雌蜂刚羽化时, 毒囊形态较瘪, 随雌蜂的发育毒囊体积迅速膨大, 蛋白含量迅速增加, 3 d 后稳定于一定水平, 并持续至死亡。未喂食蜂蜜水的蝶蛹金小蜂发育过程中, 毒腺长度变化不明显, 毒囊发育相对较慢, 雌蜂寿命明显缩短。交配和喂食蜂蜜水对蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂雌毒腺长度均无显著影响, 交配不影响两种金小蜂雌蜂毒囊大小和毒液蛋白含量, 但喂食蜂蜜水对此可产生显著正面影响。

喂食蜂蜜水并正常交配的蝶蛹金小蜂毒器官各组成部分的发育与其卵巢中成熟卵的数量均存在正相关关系, 而与其卵巢中 I 级卵和 II 级卵的数量成负相关关系。毒器官各组成部分之间的发育也呈现相应的线性关系。丽蝇蛹集金小蜂毒囊直径发育与其卵巢中 II 级卵数量存在相关关系, 毒器官其它组分与卵巢中各级卵数量均无线性相关关系。毒器官各组成部分之间的发育呈线性关系。

3 两种金小蜂毒液的蛋白组成及分子特性

蝶蛹金小蜂毒液蛋白的梯度 PAGE 电泳结果显示由 12 条谱带组成, 分子量为 17.47 ~ 879.67 kDa, 其中 7 条带大于 100 kDa, 蛋白含量以分子量为 558.64 kDa、308 kDa 和 178.17 kDa 的三条蛋白谱带为主。丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的梯度 PAGE 图谱由 9 条带组成, 分子量为 17.62 ~ 809.94 kDa, 其中以分子量为 246.20 kDa 蛋白含量为最高。SDS-PAGE 分析表

明, 蝶蛹金小蜂毒液蛋白主要由 17 条带组成, 分子量为 14.11 ~ 165.18 kDa, 其中 9 条带分子量集中于 21.17 ~ 44.41 kDa, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白由 14 条带组成, 分子量为 14.11 ~ 155.93 kDa, 其中 6 条带集中于 21.15 ~ 36.68 kDa。蝶蛹金小蜂毒液蛋白等电点集中于 4 ~ 7, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白等电点多大于 5。对蝶蛹金小蜂毒液双向电泳胶内表达量较高的 7 个点进行 MALDI-TOF 质谱分析, 并以 UCSF 的 MS-FIT 查询表明, 该 7 种蛋白与数据库中所有蛋白匹配率均不高, 最高仅为 35%。蝶蛹金小蜂毒液抑制两种寄主血细胞及 Tn 细胞系延展并引起细胞死亡的活性组分为分子量大于 100 kDa 的蛋白, 引起 Ha 细胞系死亡的活性组分也为大于 100 kDa 蛋白。

4 影响两种金小蜂毒液生理活性的理化因子分析

温度和缓冲液 pH 值对蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液生理活性有显著影响。表面活性剂 SDS、Tween 20、Triton X-100、NP 40 和 Chaps 对两种金小蜂毒液生理活性均无显著影响。1 mg/ml 的蛋白酶 K 处理 10 min 对蝶蛹金小蜂毒液无影响, 但可使丽蝇蛹集金小蜂毒液功能部分丧失, 1 mg/ml 的胰蛋白酶则可使两种金小蜂毒液活性完全丧失。缓冲液的盐浓度 (NaCl) 对两种金小蜂毒液生理活性均无显著影响。蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液正己烷提取物的水相部分有生理活性, 而有机相无生理活性, 氯仿: 乙醇提取液有机相和无机相均无生理活性。菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物及中肠液均可使两种金小蜂毒液生理活性完全丧失。

5 两种金小蜂毒液中酶的组成及酶活力的时间动态

酶化学方法测定结果表明, 两种金小蜂毒液中有碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、磷酸二酯酶、酯酶和磷脂酶, 各种酶活性随毒腺器官的发育变化均呈下降趋势。丽蝇蛹集金小蜂毒液中还有广谱蛋白酶, 而蝶蛹金小蜂毒液中则乏之。广谱蛋白酶活性在丽蝇蛹集金小蜂雌蜂羽化后前 3 d 增加较快, 而后稳定于某一水平, 直至雌蜂死亡。

6 毒液对菜粉蝶蛹血细胞数量、组成、存活及包裹作用的影响

菜粉蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液后, 血细胞数量于注射后 0.5 ~ 4 d 与未寄生蛹、注射 TBS 及注射丽蝇蛹集金小蜂毒液的蛹相比均显著升高, 注射蝶蛹金小蜂毒液后, 菜粉蝶蛹血细胞数量与同期寄生蛹相比差异不显著, 而注射 TBS 和丽蝇蛹集金小蜂毒液的菜粉蝶蛹血细胞总数与未寄生蛹相比差异也不显著。就菜粉蝶蛹血细胞日变化趋势来看, 各处理蛹血细胞总数均于 2 d 前升高, 尔后降低。

菜粉蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液后, 浆血细胞所占比例由处理后 0.5 ~ 4 d 逐渐降低, 未寄生蛹、注射 TBS 及注射丽蝇蛹集金小蜂毒液的菜粉蝶蛹浆血细胞所占比例于 0.5 ~ 3 d 变化不大, 到第 4 d 显著下降, 颗粒血细胞所占比例的变化恰反之, 蝶蛹金小蜂毒液均可显著降低菜粉蝶蛹浆血细胞的比例, 提高颗粒血细胞的比例。

蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液可显著降低菜粉蝶蛹血细胞的延展、存活及包裹反应。寄生或注射毒液后 0.5 ~ 4 d 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞的延展率、存活率及对 Sephadex A-50 珠的包裹作用均显著低于未寄生蛹、注射 TBS 及注射丽蝇集金小蜂毒液的蛹。

7 毒液对菜粉蝶和柑桔凤蝶不同虫态血细胞形态、存活和行为的影响

蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制菜粉蝶蛹和 5 龄幼虫活体浆血细胞和颗粒血细胞的延展, 注射 0.5 VRE 丽蝇蛹集金小蜂对菜粉蝶蛹和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展均无显著影响。蝶蛹金小蜂毒液还可显著影响菜粉蝶蛹和 5 龄幼虫活体浆血细胞和颗粒血细胞的存活; 丽蝇蛹集金小蜂毒液对活体菜粉蝶蛹和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的存活均无显著影响。

蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活也有显著抑制作用。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞及 5 龄幼虫浆血细胞的延展有显著影响, 对菜粉蝶蛹颗粒血细胞的延展无显著影响, 对菜粉蝶蛹和幼虫浆血细胞与颗粒血细胞的存活均无显著影响。

0.5 VRE 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制柑桔凤蝶蛹和 5 龄幼虫活体浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活。0.5 VRE 丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹和 5 龄幼虫活体浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活均无显著影响。

蝶蛹金小蜂毒液对离体培养的柑桔凤蝶蛹和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活均有显著抑制作用。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展同样有显著抑制作用, 而对柑桔凤蝶和 5 龄幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的离体存活无显著影响。

蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制菜粉蝶和柑桔凤蝶 5 龄幼虫和蛹活体和离体血细胞对 Sephadex A-50 珠的包裹反应, 丽蝇蛹集金小蜂毒液则无此作用。

8 蝶蛹金小蜂毒液对寄主蛹酚血细胞氧化酶活性及血淋巴黑化作用的影响

蝶蛹金小蜂寄生或注射其毒液对菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞中酶氧化酶活性无显著影响,

日龄对菜粉蝶和柑桔凤蝶的未寄生蛹、寄生蛹和注射 TBS 蛹及注射毒液柑桔凤蝶蛹血细胞酚氧化酶活性有显著影响,随蛹日龄的增长,血细胞中酚氧化酶活性逐渐减弱,而日龄对注射毒液菜粉蝶蛹血细胞酚氧化酶活性无显著影响。菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生或注射毒液后,血淋巴对 Sephadex A-50 黑化作用均未受到抑制,血细胞对血淋巴的黑化能力也无显著影响。蝶蛹金小蜂毒液对寄生前后含血细胞和不含血细胞的菜粉蝶蛹血淋巴离体自我黑化及对 Sephadex A-50 珠黑化作用均无抑制作用,而苯基硫脲 (PTU) 则可完全抑制这种黑化作用。

9 毒液对菜粉蝶非免疫系统组织细胞的影响

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹神经系统的脑、咽下神经节,生殖系统的睾丸、成虫卵巢,消化系统的中肠及脂肪体和幼虫丝腺细胞的存活均无任何影响,处理后 0.5 和 4 h 所有细胞的死亡率均为 0。蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑、咽下神经节、中肠及脂肪体细胞的贴壁行为有显著影响,蝶蛹金小蜂毒液存在情况下,四种细胞的贴壁行为均受到严重抑制。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的所有组织细胞的存活和贴壁行为均无显著影响。

10 毒液对蝶蛹金小蜂非寄主昆虫血细胞及昆虫细胞系的影响

蝶蛹金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活均有显著抑制作用,而丽蝇蛹集金小蜂毒液则无此作用。两种金小蜂毒液对家蝇和棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的延展和存活均有显著抑制作用,且蝶蛹金小蜂毒液的抑制作用似更强。而两者对中华稻蝗成虫、美洲大蠊成虫、瘤缘蝽若虫、假眼小绿叶蝉若虫、小菜蛾幼虫、大蜡螟幼虫、大螟幼虫、棉铃虫幼虫、家蚕幼虫、直纹稻苞虫幼虫、茶尺蠖幼虫、大猿叶虫幼虫、中华蜜蜂幼虫和黑翅土白蚁成虫血细胞的延展均无显著影响。

另外,蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制 Tn 细胞系的延展和存活,而丽蝇蛹集金小蜂毒液对 Tn 细胞系的延展和存活均无显著影响。两种金小蜂毒液对 Ha 细胞系的存活均有显著影响。

11 蝶蛹金小蜂毒液对寄主蛹表皮主要物质含量与组成的影响

蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹表皮蛋白含量均无显著影响,但可引起菜粉蝶蛹表皮中可溶性蛋白含量显著下降和柑桔凤蝶蛹表皮中可溶性蛋白含量显著升高;蝶蛹金小蜂寄生可引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹表皮脂类含量显著降低,注射毒液对表皮脂类含量无显著影响。

菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物约有 17 种, 主要为烃类(14 种), 含量约占表皮碳氢化合物总量的 90%以上; 杂环类物质、酯类和酮类各一种, 共占表皮碳氢化合物总含量的 6%左右。蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹表皮中烃类、酮类、酯类及杂环类物质的相对含量均无显著影响。柑桔凤蝶蛹表皮碳氢化合物约有 18 种, 以烃类为主 (13 种), 含量约占表皮碳氢化合物总量的 50%以上; 醇类和杂环类物质各一种, 各占表皮碳氢化合物总量的 20%以上; 有机酸 1 种, 酯类 2 种, 共占表皮碳氢化合物总量的 5%左右。柑桔凤蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 其表皮碳氢化合物 Bis(2-ethylhexyl)phthalate、Hexacosane 和 Heptacosane 的含量与未寄生对照蛹相比显著升高, 而 Oxirane, heptadecyl-的含量显著降低, 寄生对柑桔凤蝶表皮中烃类、醇类、酯类及有机酸类的相对含量均无显著影响, 而对杂环类物质的相对含量有显著影响。

12 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主蛹血淋巴和脂肪体主要物质含量的影响

寄生对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴可溶性蛋白含量均无显著影响, 注射毒液则可引起二者血淋巴可溶性蛋白含量的显著升高。寄生和注射毒液均可引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹脂肪体蛋白和血淋巴脂类含量的显著下降, 而对二者脂肪体中脂类含量则无显著影响。

13 寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中氨基酸组成的影响

寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸含量均无显著影响, 但可引起总氨基酸含量的显著下降, 注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸和总氨基酸含量均无显著影响。就氨基酸类别来说, 蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸和杂环族氨基酸含量均无显著影响, 但可导致脂肪族氨基酸含量的显著下降, 注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸和杂环族氨基酸的相对含量均无显著影响。

日龄对菜粉蝶未寄生蛹、寄生蛹、注射毒液蛹和注射TBS蛹血淋巴中总氨基酸含量均有显著影响, 而对各种氨基酸含量均无显著影响。就氨基酸种类来说, 日龄对菜粉蝶未寄生蛹、寄生蛹、注射毒液蛹和注射TBS蛹血淋巴中芳香族氨基酸含量均有显著影响, 对未寄生蛹、注射毒液蛹和注射TBS蛹血淋巴中杂环族氨基酸含量也有显著影响, 而对寄生蛹血淋巴中杂环族氨基酸含量无显著影响, 对未寄生蛹、寄生蛹、注射毒液蛹和注射TBS蛹血淋巴中脂肪族氨基酸含量均有显著影响。

关键词: 蝶蛹金小蜂, 丽蝇蛹集金小蜂, 毒液, 电泳, 质谱分析, 菜粉蝶, 柑桔凤蝶, 血细胞, 延展, 存活, 包囊反应, 非免疫系统组织, 非寄主昆虫, 昆虫细胞系, 表皮蛋白, 表皮可溶性蛋白, 表皮碳氢化合物, 表皮脂类, 脂肪体, 血淋巴, 蛋白质, 脂类, 氨基酸

Biochemical characters and physiological functions of venoms from two pteromalid wasps, *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae)

Abstract

Studies of biochemical characters and physiological functions of parasitoid were focused on braconid and ichneumonid wasps, but in other families were fewer. So we studied the biochemical characters and physiological functions of venoms from two pteromalid wasps, *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis*. The results were shown as follows.

1. Host immune inhibiting factors in the reproductive system of *Pteromalus puparum*

Extracts of ovary, eggs, oviduct from female *P. puparum* and testes, male accessory gland from male *P. puparum* had no effects on spreading, mortality and encapsulation capability of hemocytes from *P. rapae* and *P. xuthus* pupae. But venom from female *P. puparum* could inhibit the spreading and encapsulation capability of the hemocytes and elicit significant death of hemocytes. We considered venom is the host immunity inhibiting factor in *P. puparum* female. Venom functions in the parasitoid was different with venoms from braconid and ichneumonid wasps had polydnavirus.

2. Development of venom apparatus from two pteromalid wasps and their relationship with the oogenesis

The length of venom glands from female *P. puparum* and *N. vitripennis* fed with 20% honey water had no significantly change with the development of female wasps, but the diameters of venom reservoir and proteins in them increased rapidly in the first 3 days after female wasps' eclosion, and persisted at the levels until the death of female wasps. The length of venom glands from non-fed *P. puparum* and *N. vitripennis* female also had no significantly changes, but the development of venom reservoirs were much slower. Mating and feeding had no effects on the length of venom glands from *P. puparum* and *N. vitripennis* female, mating had no effects on the

diameters and protein content of venom reservoirs, but feeding had significantly beneficial effects on them.

Development of venom apparatus from mating and feeding *P. puparum* had positive relationship with the numbers of mature eggs and negative relationship with the numbers of grade I and grade II eggs from the ovary. But development of venom apparatus from mating and feeding *N. vitripennis* had no correlation with the numbers of mature eggs and immature eggs except that venom reservoir diameter had negative relationship with the numbers of grade II eggs in the ovary. Parts of venom apparatus of two pteromalid wasps also had positive relationships with each other.

3. Composition and molecular character of venom proteins from two pteromalid wasps

Analysis of the 5 ~ 15% gradient-PAGE profile revealed the presence of 12 protein bands with molecular weight ranging from 17.47 to 879.67 kDa in the *P. puparum* venom, of which 558.64 kDa, 308 kDa and 178.17 kDa proteins were the highest three in the venom. The factors in *P. puparum* venom inhibiting the spreading and inducing the death of hosts' hemocytes were both proteins with native molecular weight above 100 kDa. Conversely, 9 protein bands with molecular weight between 17.62 to 809.94 kDa were detected in the *N. vitripennis* venom.

Analysis of the 10% SDS-PAGE profile revealed the presence of 17 protein bands with molecular weight ranging from 14.11 kDa to 165.18 kDa, of which 9 protein bands between 21.17 ~ 44.41 kDa were relatively abundant, were observed in *P. puparum* venom. In contrast, 14 protein bands between 14.11 ~ 155.93 kDa, of which 6 protein bands between 21.15 ~ 36.68 kDa were relatively rich, were found in *N. vitripennis* venom. The factors in *P. puparum* venom inhibiting the spreading and inducing the death of hosts' hemocytes were both proteins with native molecular weight above 100 kDa.

pI of venom proteins from *P. puparum* were between 4 and 7, and 5 to 10 from *N. vitripennis*. After analyzed with MALDI-TOF MS for seven higher expression spots from 2-DE gel of *P. puparum* venom and searched in UCSF with MS-FIT, we found the matching ratio of the checking proteins and proteins from database were very lower, with the highest matching ratio of 35%.

4. Physical and chemical factors affected the physiological functions of venoms

from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis*

Temperature and pH had significantly effects on the physiological functions of venoms from *P. puparum* and *Nasonia vitripennis*, but detergents as SDS, Tween 20, Triton-X 100, NP 40 and chaps had no effects on them. When treated with 1mg/ml proteinase K at 37°C for 10 min, the functions of *P. puparum* venom were not affected, but the functions of *N. vitripennis* venom were partially lost. After treated with 1 mg/ml trypsin, the functions of the two pteromalid venoms were lost. Salt concentration (NaCl) in the venom distilling buffer had no effects on the functions of the two venoms. The aqueous phase of hexane extractions of the two pteromalid wasps' venom had activity, but the organic phase had no activity. Chloroform/methanol extraction could make the two venoms lose their physical functions both in organic and aqueous phase. 5th instar *P. rapae* larvae salivary secretion and mid-gut fluid incubated with the two venoms at 37°C for 10 min could make them be inactive.

5. Enzyme categories and their activity dynamic in the venoms from two pteromalid wasps

Alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphodiesterase, phospholipase and esterase were detected in the two pteromalid wasps venoms, the enzyme activity in the venoms were declined with the development of the two pteromalid wasps. Protease were only detected in the venom of *N. vitripennis*, the enzyme activity increased rapidly at the first 3 days after the eclosion of the female wasps, and then stabled at the level till death.

6. Venoms from two pteromalid wasps on the number, composition, spreading, viability and encapsulation capability of hemocytes from *Pieris rapae* pupae

Both in parasitized and *P. puparum* venom injected hosts, total hemocytes counts (THCs) were significantly higher than those of the non-parasitized, TBS-injected and *N. vitripennis* venom injected ones, while there were no marked difference in THCs between parasitized and *P. puparum* venom-injected hosts. As to *N. vitripennis* venom-injected pupae, the changes of THCs were similar to those of non-parasitized and TBS injected ones. THCs in the treated pupae were all increased at the first 2 days after pupation and then decreased gradually.

Percentage of plasmatocytes in parasitized and *P. puparum* venom injected *P. rapae* pupae were

decreased gradually after the treatment for 0.5 to 4 days. But the percentage of plasmatocytes in parasitized and *P. puparum* venom injected *P. rapae* pupae had no significant changes after the treatment for 0.5 to 3 days, but decreased at the 4th day after treatment. The changes of granular cells percent from *P. rapae* pupae were on the opposition. Parasitization and *P. puparum* venom injection could decrease the percentage of *P. rapae* pupae plasmatocytes, and increase granular cell percentage. Parasitization or *P. puparum* venom injection could decrease the spreading percentage, viability and encapsulation capacity of *P. rapae* pupae hemocytes, but *N. vitripennis* venom injection had no effects.

7. Effects of venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* on the spreading, viability and encapsulation capability of hemocytes from *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* 5th instar larvae and pupae

The spreading percentage of plasmatocytes (PLs) and granular cells (GRs) from *P. rapae* and *P. xuthus* 5th instar larvae and pupae decreased significantly after injected with 0.5 VRE (venom reservoir equivalent) *P. puparum* venom for 0.5 to 96 h. *P. puparum* venom also had negative effects on the viability of PLs but not GRs from *P. rapae* and *P. xuthus* 5th instar larvae and pupae *in vivo*. Injected with 0.5 VRE *N. vitripennis* venom had no effects on spreading and viability of PLs and GRs from *P. rapae* and *P. xuthus* 5th instar larvae and pupae.

P. puparum venom with concentrations from 0.002 to 0.02 VRE/ μ l had serious effects on spreading and viability of PLs and GRs from *P. rapae* and *P. xuthus* 5th instar larvae and pupae *in vitro*. But *N. vitripennis* venom only had significant effects on cell spreading with concentration above 0.016 VRE/ μ l and had no significant effects on cell viability.

P. puparum venom could reduce the encapsulation capability of hemocytes from *P. rapae* and *P. xuthus* 5th instar larvae and pupae *in vivo* and *in vitro* significantly.

8. Effects of *Pteromalus puparum* venom on the hemocyte phenoloxidase activity and melanization capability of hemolymph from *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* pupae

The hemocytes phenoloxidase activity decreased gradually with the development of non-parasitized, parasitized and TBS-injected and *N. vitripennis* venom injected *P. rapae* and *P.*

xuthus pupae, but maintained at the same level in *P. puparum* venom injected hosts after injected for 0.5 to 4 days. Parasitization or *P. puparum* venom injection had no effects on melanization capability of hemolymph from *P. rapae* and *P. xuthus* pupae to Sephadex A-50 beads. Hemocytes also had no effects on the melanization capability of hemolymph. *P. puparum* venom had no effects on melanization capability of parasitized and non-parasitized *P. rapae* hemolymph with or without hemocytes, but PTU could inhibit the melanization completely.

9. Effects of venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* on the non-immune system organic cells

Venom from *P. puparum* had no effects on viability of brain, subpharyngeal ganglion, testis, female adult ovary, silk-gland of larvae, mid-gut and fat body cells, but could prevent the adhering behavior of brain, subpharyngeal ganglion, mid-gut and fat body cells. On the opposite, venom from *N. vitripennis* had no effects on the viability and adhering behavior of these cells.

10. Effects of venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* on hemocytes from non-target insects of *Pteromalus puparum* and insect cell lines

Venom from *P. puparum* but not *N. vitripennis* could inhibit the spreading and viability of PLs and GRs from *Spodoptera litura* larvae *in vitro* significantly. Both of venoms from the two pteromalid wasps had adverse effects on the spreading and viability of PLs and GRs from *Musca domestica* and *Sarcophaga peregrine* larvae *in vitro*.

Conversely, venoms from the two pteromalid wasps had no effects on the spreading of hemocytes from non-target insects of *P. puparum* as, *Oxya chinensis*, *Periplaneta americana*, *Odontotermes formosanus*, *Acanthocoris scaber*, *Empoasca vitis*, *Plutella xylostella*, *Galleria mellonella*, *Sesamia inferen*, *Helicoverpa armigera*, *Ectropis oblique*, *Bombyx mori*, *Parnara guttatus*, *Colaphellus bowringi* and *Apis cerana* *in vitro*.

P. puparum but not *N. vitripennis* venom had adverse effects on spreading and viability of Tn cells *in vitro*. Both of the two venoms could induce the significant death of Ha cells *in vitro*.

11. Effects of *Pteromalus puparum* venom on the composition and content of main substance in cuticle of *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* pupae

Parasitization or *P. puparum* venom injection had no effects on the titers of cuticular proteins of

P. rapae and *P. xuthus* pupae, but could induce the increasing of soluble protein titers in cuticle of *P. rapae* pupae and decreasing in *P. xuthus* pupae. Titters of cuticular lipid in *P. rapae* and *P. xuthus* pupae decreased significantly after parasitized by *P. puparum*. But venom injection had no effects on these.

17 kinds of cuticular hydrocarbon were detected in the *P. rapae* pupae cuticle, including 14 kinds of hydrocarbon, 1 kind of heterocycle, ester and ketone was detected, respectively, of which hydrocarbon accounting for more than 90% of the total mass. Parasitization had no effects on the relative contents of different cuticular hydrocarbon in *P. rapae* pupae cuticle. *P. xuthus* cuticle contained 18 kinds of cuticular hydrocarbon, including 13 kinds of hydrocarbon, 2 kinds of ester, 1 kind of alcohol, heterocycle and organic acid, respectively. After parasitization, relative contents of Bis(2-ethylhexyl)phthalate, Hexacosane and Heptacosane were increased significantly, but Oxirane, heptadecyl- decreased significantly.

12. Effects of *Pteromalus puparum* venom on the metabolism of protein and lipid in hemolymph and fat body of *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* pupae

The titers of hemolymph soluble proteins in parasitized *P. rapae* and *P. xuthus* pupae were similar to non-parasitized ones, but increased significantly in the venom injected pupae. The total lipid titers in hemolymph of parasitized and venom injected pupae decreased significantly. The titers of soluble proteins in the fat body decreased after parasitization or *P. puparum* venom injection *P. rapae* and *P. xuthus* pupae; whereas the lipid titers in the fat body maintained at the same level as non-parasitized or TBS injected ones.

13. Parasitization and *Pteromalus puparum* venom injection on the composing of amino acid in *Pieris rapae* pupae hemolymph

Parasitization had no effects on the relative contents of different amino acids in the *P. rapae* pupae hemolymph, whereas induced the decreasing of the titer of total amino acid. But *P. puparum* venom injection had no effects on the relative contents of different amino acids and titer of total amino acid in *P. rapae* pupae hemolymph. Parasitization had no effects on the relative contents of aromatic and heterocyclic amino acid, but could induce the significant decreasing relative contents of aliphatic amino acid in the *P. rapae* pupae hemolymph. Conversely, venom

injection had no effects on the relative contents of aromatic, heterocyclic and aliphatic amino acid in the *P. rapae* pupae hemolymph.

Age had significant effects on total amino acid amount in non-parasitized, parasitized, venom-injected and TBS-injected *P. rapae* pupae hemolymph, but had no effects on different amino acids relative contents of them.

Key words: *Pteromalus puparum*, *Nasonia vitripennis*, Venom, Electrophoresis, MALDI-TOF analysis, *Pieris rapae*, *Papilio xuthus*, Hemocyte, Spreading, Viability, Encapsulation capability, Non-immune system, Non-target insects, Insect cell lines, Cuticular protein, Soluble protein in cuticle, Cuticular hydrocarbon, Cuticular Lipid, Fat body, Protein, Lipid, Amino acid.

前 言

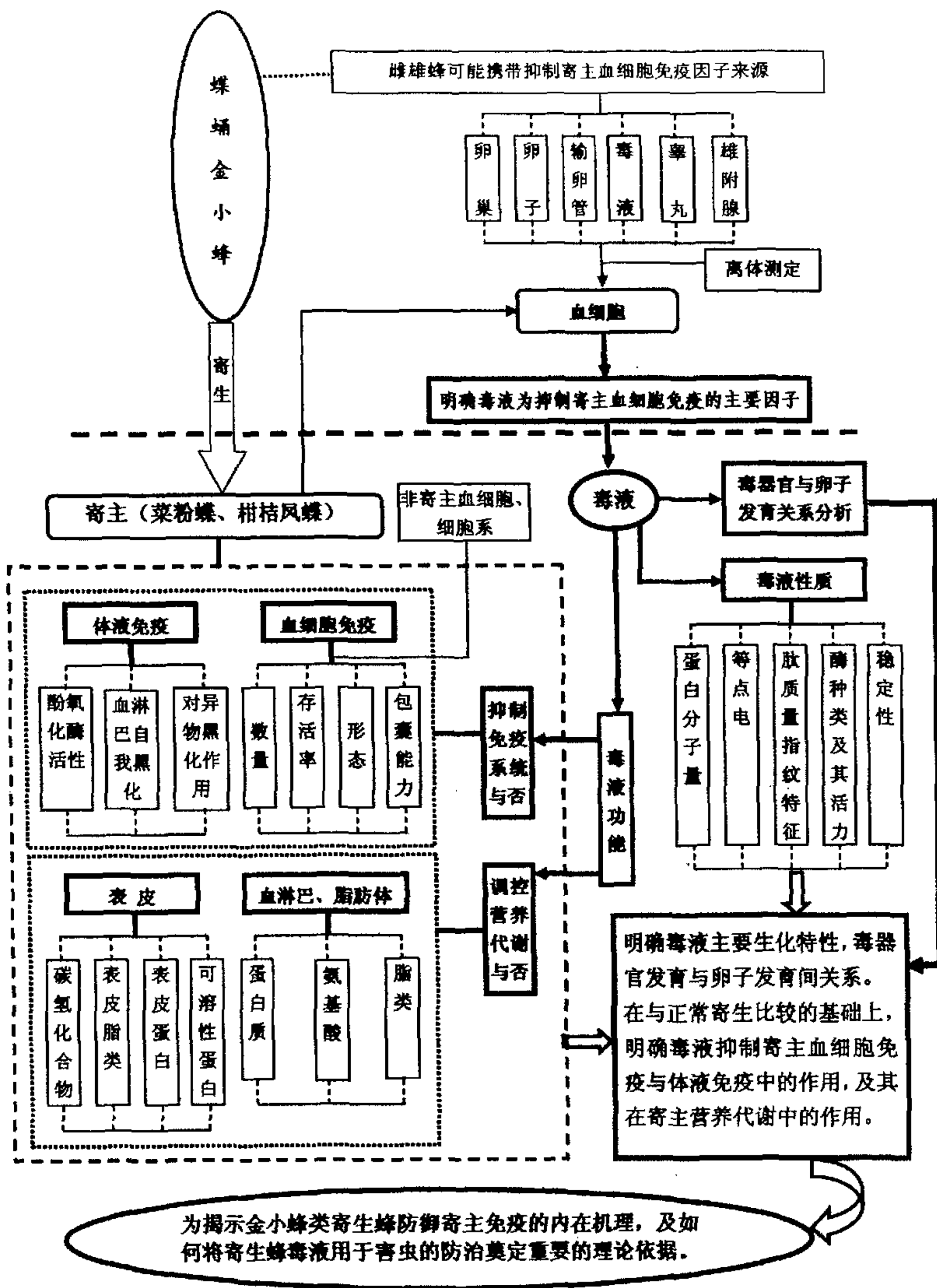
随着人类生活水平的改善和提高,国际社会和广大公众对农产品安全性的要求日趋严格,对大幅度降低其化学农药(或其它非安全性物质)污染与残留的期望日益迫切。正因如此,自20世纪90年代以来,世界各国尤其是发达国家先后均提出了倡导生物防治和农业防治为主的害虫治理策略,以减少化学农药用量的短期和长期行动计划(Matteson, 1995)。为此,我国也采取了相应的积极措施,农业部于2001年4月就正式启动了“无公害食品行动计划”。尽管如此,迄今生产上害虫防治仍过多依赖于化学农药,化学农药销售和用量仍有增无减,农药残留超标问题仍未根本解决。据统计,目前我国农药年使用量超过130万吨,单位面积用量达世界平均水平的2倍;农药污染的农田达1.4亿亩,全国每年因污染造成的直接经济损失高达160多亿元。不仅如此,化学农药使用中更严峻的问题是,农药品种结构不合理,高毒、剧毒品种用量居高不下。这种状况已导致了环境污染和残留超标的严重后果,如,据农业部组织有关部门对北京、天津、上海和山东等地蔬菜抽样检测结果显示,2001~2003年农药残留平均超标15%~37.5%。即使到了实施“无公害食品行动计划”第四年的2004年平均超标率还有2.5%,有的还严重超标。不仅如此,而且也使得我国具有明显价格优势的劳动密集型产品,如蔬菜、果品、茶叶等农产品的出口难以攻破入世后日益增多的国外绿色技术壁垒,使我国仍处于每个农业劳动力农产品出口额的世界最低水平行列(据统计与发达国家差距400~500倍)。如,2002年浙江省保鲜蔬菜和暂时保藏蔬菜因毒死蜱残留超标而出口日本的量分别下降了20%和29%。若这些问题不能从根本上得以解决,面对欧盟和日本等更为严格的新农药残留标准,我国农产品出口将面临更大的挑战。因此,如何结合现代生物技术等新技术,深入探索害虫生物防治的新原理与新方法,研制具自主知识产权的环境友好型生防制剂,开辟害虫生物防治新途径,乃是当前及今后相当长时间内亟待解决的重大科学问题。

寄生蜂是一类重要的害虫生防作用物,在传统生防中业已得到充分的肯定。据 van Driesche 等(1996)统计,在释放860种天敌防治2741种害虫的事例中,216例成功事例中就涉及到393种寄生蜂。然而,至今仍大多使用寄生蜂个体防治害虫,这样其生产规模有时难以扩大,大田使用时还会受环境因子等影响而失去应有的效果。若能利用寄生蜂控制害虫的一些活性物质如抑制寄主免疫或调控寄主生长发育的毒液,再结合现代生物技术可能将使寄生蜂发挥更大的作用。寄生蜂毒液在害虫生防中有着广阔的应用潜力,它不仅有望直接研发成新型杀虫活性物质,而且因其对寄主害虫免疫系统的扰乱还有望提高自然界害虫病原

菌对害虫的自然控制作用 (Jones *et al.*, 1993; Dani *et al.*, 2003; Backage *et al.*, 2004)。鉴于蝎子、蜘蛛和社会性膜翅目昆虫等毒腺毒液中碱性毒蛋白 (多肽或酶) 研究与应用已有成果, 结合现代生物技术, 寄生蜂毒液将比寄生蜂其它抑制寄主免疫或调控寄主生长发育因子 (如 PDV 基因组以多个大小不一的 DNA 片段组成, 并整合于寄生蜂基因组中, 它的应用不及毒液蛋白容易) 更易用之于害虫的防治。如今蝎子毒素基因已成功地用于构建重组杆状病毒杀虫剂 (McCutchene *et al.*, 1991; Regev *et al.*, 2003) 和培育转基因抗虫作物 (Barton *et al.*, 1990)。但这类毒素有神经性麻痹作用, 其生态和食品安全的风险性较大。相比之下, 内寄生蜂毒液在这方面的应用可能更为安全, 因为大多数内寄生蜂毒液蛋白不同于蝎子等毒液蛋白, 系分子量较大的酸性蛋白 (Leluk *et al.*, 1989), 仅能抑制寄主免疫、调控寄主生长发育等, 而无神经麻痹作用 (Jones *et al.*, 1993; Quicke, 1997; Backage *et al.*, 2004)。正因如此, 内寄生蜂毒液的生理活性物质的组成及其生理功能, 以及活性物质的基因等研究颇值得加强, 然而这方面研究至今仍相当薄弱。

蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 是一种菜粉蝶 *Pieris rapae* 和柑桔凤蝶 *Papilio xuthus* 的蛹期重要寄生蜂, 生防潜力颇大。其生物学和生态学 (胡萃, 1986; 胡萃和万兴生, 1988; 胡萃和俞伯良, 1987) 及其与寄主的生理关系已有较详研究 (吕慧平等, 2000; 蔡峻等, 2000; 2001; 2002; Cai *et al.*, 2001; 2004), 在此基础上, 我们开展对其毒液中生理活性因子的研究。丽蝇蛹集金小蜂是一种高等双翅目蝇类的蛹期特异性寄生蜂。对其研究主要侧重于其体内 *Wolbachia* 共生菌对其性别决定的研究 (Nur *et al.*, 1988; Werren *et al.*, 1986; 1987; Bordenstein & Werren, 1998; Werren & Minnot, 1999; Pultz *et al.*, 2000; Tram & Sullivan, 2002; Rivero *et al.*, 2003; Shuker & West, 2004; Shuker *et al.*, 2004)、丽蝇蛹集金小蜂寄生及其毒液对寄主的免疫抑制、营养调控及对非寄主昆虫及细胞系的研究 (Rivers & Denlinger, 1994; 1995 a; 1995b; Rivers *et al.*, 1993; 1999; 2002; Rivers, 2004), 而对丽蝇蛹集金小蜂毒器官发育及毒液蛋白组成及毒液功能研究尚少。两种金小蜂有较近的亲缘关系, 且均属蛹期特异性寄生蜂, 但蝶蛹金小蜂属内寄生蜂, 而丽蝇蛹集金小蜂属外寄生蜂, 两种毒液既有相同之处, 又有其各自特点, 我们通过对二者性质与功能比较的研究, 一方面为明确寄生蜂毒液对其寄主和非寄主的调控作用、昆虫对其自然寄生蜂和非自然寄生蜂毒液的反应是否相同, 以对寄生蜂与寄主关系的理论加以充实, 另方面也为筛选新型杀虫活性物质, 为研发环境友好与食品安全型的生防制剂或生物杀虫剂增效剂提供具自主知识产权的新型杀虫基因奠定基础。最终目的为我国“绿色农业”的实现与可持续发展提供害虫生物控制的新策略与新途径。

本论文技术路线如下：



单位代码 10335
研究生学号 10216026

博士学位论文

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液的生化 特性与生理功能

答辩委员会主席： 王荫长 教授 （南京农业大学植保学院）

论文评阅人： 钦俊德 院士 （中科院动物所）

郭子元 院士 （中国农科院植保所）

王荫长 教授 （南京农业大学植保学院）

王琛柱 研究员 （中科院动物所）

庞义 教授 （中山大学昆虫所）

论文答辩日期： 二零零五年六月十四日

本研究承蒙

国家自然科学基金项目
(编号: **30170626**)

浙江省青年科技人才专项基金项目
(编号: **R303489**)

资助

致 谢

论文付梓之际，感慨万千，借方寸之地向所有关心、支持和帮助我的领导、老师、同学和亲友表示最诚挚的谢意！

本论文由胡萃和叶恭银两位教授悉心指导完成，论文字字句句无不凝聚着导师的心血，课题制定及论文写作过程是导师辛苦耕耘的过程，也是我聆听导师教诲的过程，“做学问，首先做人”的思想使我终生受益。二位师母在平时生活及思想上给予我很大帮助，姚洪渭副教授在平时学习、工作和生活上给予帮助颇多，在此表示感谢！

实验过程中，本所何俊华教授、程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、沈志成教授、施祖华教授、徐志宏教授、祝增荣研究员、莫建初教授、唐启义研究员、娄永根教授、蒋明星教授、余虹副教授、刘银泉副教授和马云高级实验师等在实验方面提供诸多便利，感谢各位教师的真诚帮助！同时，感谢浙江大学农业与生物技术学院研究生培养科袁熙贤老师、吴晓晶老师及马永芳老师在学习和生活上的关心与照顾！山东农业大学郑方强和许永玉两位老师及我的硕士导师——贵州大学李子忠教授在本人学习和工作上给予了无私帮助，向他们表示诚挚的谢意！

浙江大学应用昆虫学研究所给我提供一个宽松、融洽、令人愉悦的生活和工作环境，实验过程得到已毕业学长学姐的热心帮助，南开大学蔡峻博士在昆虫血细胞离体培养技术上给予很大支持，并为课题提出诸多有益建议，吕慧平、刘志诚、朱光辉、蒋彩英、傅强等博士毕业后还常关心本人课题的进展，杭州师范学院王世贵博士为实验提供便利条件，实验过程中还得到已经毕业硕士张焘、姚鹏程和韦国栋的帮助。本实验室李凯、陈茂、吴国星、黄诚华、王慧、陈亮、卢新民、谭红、李芳芳、董胜张、石宇、高熹、王欢、吴玛莉、朱家颖、方琦、慎小品、袁志东、董卉等同学在试验过程中提供帮助；本科生马国栋、田俊策、王升参与部分试验；余新友和叶恭堂、叶恭郎及陈威在实验准备及论文打印等方面给予帮助，在此向他们一并表示感谢！三年学习工作中还得到张素芳、施婉君、戴仁怀、白素芬、李江红、桂连友、安世恒、尚金燕、杨天赐、吕建华、李增梅、郦卫弟和王伟等同学的帮助；本院郑小军老师提供了部分实验材料，向他们表示感谢！

感谢我的父母、岳母、妹妹及妹夫，他们的无私支持与帮助使我顺利完成学业。特别感谢我的夫人李海霞女士，她用柔弱的肩膀撑起一个家，是她的孝心使我在外求学而无后顾之忧，安心完成学业，让我在顺利完成学业的同时，拥有一个可爱活泼的儿子和幸福的家庭。这一切是我努力拼搏、勇往直前的重要支撑。

最后，谨向参加论文评阅及答辩委员会的专家、教授们致以崇高的敬意！

叶恭银

05.5.31

于军家作

第一部分 文献综述

第一章 寄生蜂毒液蛋白性质与功能的研究进展

寄生蜂毒液一般由 3 种腺体分泌, 即分泌酸性粘多糖和脂蛋白的卵巢管腺 (oviduct or uterus gland)、分泌中性粘多糖的中毒腺 (poison gland) 和分泌胆固醇酯和卵磷脂类磷酸脂的杜氏腺 (Dufour's gland), 其腺体的形态和超微结构因寄生蜂种类而异 (Ratcliffe & King, 1969; Edson & Vinson, 1979; Coudron & Jones, 1994)。

内寄生蜂和外寄生蜂毒液的功能有所不同。外寄生蜂的毒液主要作用于神经细胞的触突, 表现有麻痹作用; 而有些种类也具扰乱寄主内分泌和营养代谢及阻止生长发育的功能 (Grossniklaus-Bürgin, 1998)。内寄生蜂毒液大多是非麻痹性的, 单独或与其它抑制寄主免疫因子结合具抑制寄主血细胞免疫、调控寄主生长发育、抑制寄主生殖系统发育及调节寄主的内分泌等功能。毒液的主要成分是蛋白质, 还包括一些类病毒微粒 (Lawrence & Akin, 1990) 和有机化合物 (Fukushima *et al*, 1990; Skinner *et al*, 1990; Shimizu *et al*, 1993), 其中研究较多的是蛋白质, 故本章就寄生蜂毒液蛋白性质与功能的国内外研究概况作一介绍。

1 寄生蜂毒器官的形态及分泌模式

寄生蜂毒器官包括具有分泌功能的毒腺和具贮藏功能的毒囊组成, 此结构起源于外胚层, 开口于阴道背部或输卵管。毒囊一般由三层细胞组成, 由外向内依次为肌肉鞘、分泌细胞层和扁平细胞层, 毒腺仅由分泌细胞层和扁平细胞层组成。

寄生蜂毒器官的结构研究较早, Ratcliffe 和 King (1969) 描述了丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒腺的超微结构; van Marle (1977) 比较了麦蛾茧蜂 *Bracon heberor* 和泥蜂 *Philanthus triangulum* 毒腺的结构; Edson 和 Vinson (1979) 研究 160 种茧蜂毒器官的形态, 并分为两种类型: 一类是代表在较原始的亚科特征 (较低等的进化模式), 包括 Doryctinae, Spathiinae, Braconinae, Rogadinae, Opiinae, Alysiinae, Ichneutinae 和 Aphidiinae 等亚科, 另一类是较进化的亚科特征 (较高等的进化模式), 包括 Cheloninae, Microgasterinae, Agathidinae, Microcentrinae, Helconinae, Neoneurinae, Centitistinae, axylommatainae, Euphorinae and Apohidiinae 等亚科。Edson 等 (1982) 又对 7 亚科 9 种茧蜂的毒器官的超微结构进行比较, 进一步阐明两种类型毒器官的区别, 即 I 型毒器官的毒囊肌肉层等厚, 且受神经支配, 内膜不均等增厚; II 型毒器官的毒囊有较薄的质地更均一的内膜, 且两种类型毒器官的毒腺超微结构类似。Quicke 等 (1992) 研究了 10 亚科 84 属茧蜂毒器官结构, 并讨论了毒腺和

毒囊对所涉及系统的重要性和进化意义。

2 寄生蜂毒液的组分与性质

膜翅目针尾部毒液性质的研究较为详尽,寄生蜂毒液性质的研究相对薄弱。寄生蜂毒液主要由蛋白混合物组成 (Strand *et al.*, 1994)。Leluk 等 (1989) 对 21 属 25 种膜翅目昆虫毒液蛋白组成及免疫相似性进行比较发现,在蚁类、社会性蜂类和蜜蜂的毒液中普遍存在低分子量蛋白和多肽,而在所研究的 6 种姬蜂毒液中均不含此低分子量蛋白或小肽,除蜜蜂外,低分子量蛋白均不含甘露糖;姬蜂和蚁类毒液蛋白以酸性蛋白为主,而社会性蜂类和蜜蜂毒液主要是中性蛋白和碱性蛋白;茧蜂毒液中的有些蛋白与高等膜翅目昆虫毒液蛋白有免疫反应,说明两种毒液在组成甚至功能上存在一定的进化关系。除蛋白质外,有的寄生蜂毒液中还存在有机类小分子物质。例如,菜氏棱角肿腿蜂 *Goniozus legneri* 中有永久性不完全麻痹毒液的还包括多胺、腐胺、脯氨酸和少量多巴胺,其中多胺具阻碍神经和肌肉膜阳离子通道的功能 (Skinner *et al.*, 1990); 粘虫绒茧蜂 *Apanteles kariyai* 的毒液和毒囊中存在芳香族氨基酸及其衍生物:酪氨酸、酪胺、4-羟基苯乙酸、色氨酸和尿氨酸,并检测出两种芳香族氨基酸的代谢途径,即酪酸和羟基苯乙酸—酪氨酸,犬尿氨酸—色氨酸 (Shimizu *et al.*, 1993); 在麦蛾茧蜂 *Bracon hebetor* 的螫刺腺 (一种毒腺和杜氏腺的复合物) 中也已发现一种新的功能未知的二萜 (Fukushima *et al.*, 1990)。

寄生蜂毒液活性组分的分离已经有较多研究,前人对寄生蜂毒液中活性蛋白组分的分离和功能的研究概况见表1-1。

寄生蜂毒液蛋白组分的基因克隆方面也已有不少研究。Jones等 (1994) 建立了近曲斑甲腹茧蜂 *Chelonus* sp. near *curvimaculatus* 毒液的cDNA文库,发现编码33 kDa蛋白的基因可编码一个信号肽,而接于N-端的5000 kDa的疏水域的成熟蛋白序列由12个带电串联重复序列组成,除了第8个截短的终止于脯氨酸的重复序列以外,其它重复序列大约由14个氨基酸残基组成,并且描述了33 kDa蛋白的一、二、三、四级结构。而近曲斑甲腹茧蜂毒液中52 kDa蛋白是一种酸性蛋白 (pI为4.8~5.0),毒液cDNA文库中筛选出的阳性克隆经分离、测序后,发现其有一个开放的阅读框架,编码一个483个氨基酸的蛋白,其序列与62 kDa的几丁质酶具很高的同源性和相同的保守区域,且这两种蛋白在382~464残基之间的部分有相似的二级结构,但此处的氨基酸序列却明显不同,这个区域是52 kDa蛋白独有的结构,此蛋白存在于几丁质相关的内寄生蜂毒囊中,而不致使之消解,可能与这个部分的结构有关 (Krishnan等, 1994)。

表 1-1 寄生蜂毒液的蛋白组分的性质和功能

Table 1-1 Character and functions of venom proteins from different parasitoid species

Venom origin	Molecular weight (kDa)	Character and function	Reference
<i>Apidius ervi</i>	21, 36	均为非糖基化的蛋白, 可能是多亚基蛋白的亚基	Digilio <i>et al.</i> , 2000
<i>Bracon hebetor</i>	73	杀虫活性	Quistad <i>et al.</i> , 1994
<i>Cardiochiles nigriceps</i>	> 30	66 kDa 的蛋白可导致寄主幼虫历期的延长	Tanaka & Vinson, 1991
<i>Chelonus sp. near curvimaculatus</i>	32.5, 47, 53, 131	32.5, 53 和 131 kDa 的蛋白为糖蛋白, pI 为 4.9 ~ 6.9, 无蛋白酶活性, 也无抗胰蛋白酶或抗糜蛋白酶活性, 缺少碱性蛋白酶、类胰蛋白酶和类糜蛋白酶	Jones & Leluk, 1990; Jones <i>et al.</i> , 1994
	33	存在二聚体, 有一个 14 个氨基酸残基的重复序列	Jones <i>et al.</i> , 1994
	52	为酸性蛋白, 与 62 kDa 的几丁质酶同源性很高	Krishnan <i>et al.</i> , 1994
<i>Cotesia rubecular</i>	1.598	对菜粉蝶微红盘绒茧蜂 PDV 基因在菜粉蝶血细胞中的表达是必需的	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>Euplectus comstockii</i>	66	抑制寄主发育 对温度、有机溶剂、酸度及蛋白酶均比较敏感	Coudron & Brandt, 1996
<i>Habrobracon hebetor</i>	18	抑制昆虫神经传导	Slavnova <i>et al.</i> , 1989
<i>Microplitis demolitor</i>	64.5, 30.8		Strand <i>et al.</i> , 1994
<i>Pimpla hypochondriac</i>	390	酚氧化酶	Parkinson & Weaver, 1999
	27	引起家蝇成虫麻痹	
	< 13	对昆虫细胞系 SF21 有毒性	
	12, <13	抑制酚氧化酶活性	
	28, 32	抑制血细胞的聚集和包裹反应	Parkinson <i>et al.</i> , 2002
	74	血管紧张肽转换酶类似酶 (Angiotensin-converting enzyme (ACE)-like enzyme) 活性	Dani <i>et al.</i> , 2003

在瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液的 cDNA 文库中分离到了 3 个基因, *POI*, *POII*, *POIII*, 它们都与原酚氧化酶 PPO 的产物相关, 但其氨基酸序列同 PPO 相比有所不同 (Parkinson *et al.*, 2001); 对家蝇有毒性的蛋白是自然分子量为 22 kDa 蛋白, 通过 MALDI-TOF 分析证明, 其由 10.544 和 6.318 kDa 的两亚基组成, 大亚基的基因编码 15 kDa 蛋白, 有一个信号肽切割位点, 说明此蛋白合成时由一个原始肽, 经酶解后变为成熟肽贮藏于毒囊中 (Parkinson *et al.*, 2002)。在毒腺 cDNA 文库中筛得一编码 25.3 kDa 蛋白 cDNA, 它含有一信号肽, 并与丝氨酸

蛋白酶有相似核苷酸序列, 在毒液中对应28和32 kDa的蛋白, 此2种蛋白可抑制寄主血细胞的聚集和包囊反应 (Parkinson *et al.*, 2002); 另外, 毒腺cDNA文库中的5个cDNA克隆, 其中 *vpr1* 和 *vpr3* 编码32 kDa左右的蛋白, 但其序列与Genbank中的任何蛋白序列均无相似性; *vpr2* 编码57 kDa蛋白, 此蛋白与果蝇一未知功能蛋白相似; *tre1* 基因编码61 kDa蛋白, 与海藻糖酶有很大的相似性; *lac1* 编码76 kDa蛋白的3个区域与富组氨酸的铜结构域极相似, 且与真菌 *Coprinus cinereus* 的漆酶有一定的相似性 (Parkinson *et al.*, 2003)。麦蛾茧蜂 *B. hebetor* 毒腺中具杀虫剂活性的3种毒液蛋白中分子量最大的为73 kDa, 3种毒素杀虫活性均很高, 颇具生防潜力 (Quistad *et al.*, 1994)。

3 寄生蜂的毒液的生理功能

寄生蜂的毒液与其它抑制寄主免疫因子互作有抑制寄主的免疫、调控寄主的生长发育和生殖系统的发育、调节寄主的内分泌等作用 (见表 1-2)。因毒液的来源和功能有多样性, 许多情况下, 它与卵萼液即多分 DNA 病毒、畸形细胞、卵巢蛋白等其它调控因子共同起作用, 故对毒液的具体作用作进一步阐述。

3.1 抑制寄主免疫

3.1.1 细胞免疫

寄生蜂的毒液与其它抑制寄主免疫因子相互作用 (卵萼液、畸形细胞等) 可降低寄主血细胞对寄生蜂卵及异物的包囊率、改变细胞的延展性、浆血细胞总量和各类血细胞的数量, 而有些寄生蜂如茧蜂 *Leptopiline heterotoma* 的毒液可以改变黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 片状细胞 (lamellocyte) 的形状, 使之出现双极化形状 (bipolar morphology), 并丧失粘性, 片状细胞裂解后形成大量的 lamelloylsin 碎片 (Rizki & Rizki, 1992; 1994)。Webb & Luckhart (1994) 认为索诺姬蜂 *Campoletis sonorensis* 的毒液和卵巢蛋白通过破坏寄主浆血细胞和颗粒血细胞的细胞骨架来抑制寄主对蜂卵的包囊反应, 而有些寄生蜂毒液并不能破坏寄主血细胞的细胞骨架 (Cai *et al.*, 2004)。寄生蜂毒液及其它抑制寄主免疫因子对寄主血细胞的影响见表 1-3。

3.2 调控寄主的生长发育

寄生蜂的毒液单独或与其它免疫因子协作可调控寄主的生长发育和变态, 包括两种类型。一种是生长抑制型, 如黑头折脉茧蜂 *Cardiochiles nigriceps* (Guillot & Vinson, 1972)、

表 1-2 寄生蜂毒液的功能

Table1- 2 Functions of venoms from parasitic wasps

Venom functions	Reference
致死 Death	Rivers <i>et al.</i> 1993; Doury <i>et al.</i> , 1995; Moreau <i>et al.</i> , 2002
暂时麻痹 Temporary paralysis	Parkinson & Weaver, 1999
永久麻痹 Permanent paralysis	Bocchino & Sullivan, 1981; Visser <i>et al.</i> , 1983; Klein & Becakge, 1990; Libesert, 2003
抑制包囊和吞噬反应 Inhibit of encapsulation and phagocytosis	Kitano, 1982; Davies <i>et al.</i> , 1987; Tanaka, 1987 a; Richards & Edwards, 2000a, b; Parkinson <i>et al.</i> , 2002; Cai <i>et al.</i> , 2004
导致细胞形态变化, 并引起细胞死亡 Effects of morphology and mortality of host hemocytes	Tanaka, 1987 b; Rizki & Rizki, 1990; 1991; Richards & Edwards, 1999 b; Richards & Parkinson, 2000; Rivers <i>et al.</i> , 2002
抑制酚氧化酶活性 Inhibition of phenoloxidase activity	Lehmann-Danzinger, 1984; Richards & Edward, 2000; Shelby <i>et al.</i> , 2000; Willers & Asgari <i>et al.</i> , 2003; Zhang <i>et al.</i> , 2004a
细胞系毒性 Cytotoxicity to cell lines	Rivers <i>et al.</i> , 1993; Parkinson & Weaver, 1999; Rivers <i>et al.</i> , 1999; Rivers, 2004
导致表皮包囊 Inducing cuticular encystment	Arthur & Ewen, 1975
影响 PDV 在体内脱衣壳/离体存在的持久性 Effect PDV uncoating <i>in vitro</i> and PDV persistence <i>in vivo</i>	Stoltz <i>et al.</i> , 1988
对 PDV 基因在寄主血细胞内的表达是必需的 Required for PDV expression in host hemocytes	Zhang <i>et al.</i> , 2004 b
停止发育或降低发育速率 Cessation of development or reducing growth ratio	Bocchino & Sullivan, 1981; Thompson, 1982a; Visser <i>et al.</i> , 1983; Uematsu & Sakanoshita, 1987; Coudron <i>et al.</i> , 1990; Kelly & Coudron, 1990; Rivers & Denlinger, 1994; Morale-Ramos <i>et al.</i> , 1995; Coudron & Brandt, 1996; Alleyne & Beckage, 1997; Coudron <i>et al.</i> , 1997; Gelman <i>et al.</i> , 1997; Marris <i>et al.</i> , 1999; Richards & Edwards, 1999 b; Coudron <i>et al.</i> , 2000; Nakamatsu <i>et al.</i> , 2001
阻止寄主蜕皮 Blocking host ecdysis	Uematsu & Sakanoshita, 1987; Steiner, <i>et al.</i> , 1999
抑制寄主前胸腺活动 Suppression of host thoracic gland activity	Beckage, 1985; Tanaka <i>et al.</i> , 1987; Tanaka & Vinson, 1991; Pennacchio <i>et al.</i> , 1997, 1998; Kelly <i>et al.</i> , 1998;
调控代谢 Regulation of metabolism	Waller, 1965; Dahlamn & Vinson, 1976; Thompson, 1982 b; Pick & Spanjer, 1986; Guerra <i>et al.</i> , 1993; Rivers & Denlinger, 1994, 1995 a, 1995 b; Morales-Ramos <i>et al.</i> , 1995; Doury <i>et al.</i> , 1995, 1997; Alleyne & Beckage, 1997; Alleyne <i>et al.</i> , 1997; Thompson & Dahlman, 1998; Marris <i>et al.</i> , 1999
促进热激蛋白的转录 Upregulation of transcripts of heat shock proteins	Rinehart & Denlinger, 2002
降低胆碱酯酶的活性 Reduced cholinesterase activity	El-Sawaf & Zohdy, 1976
抗菌活性 Antibacterial activity	Dani <i>et al.</i> , 2003

表 1-3 寄生蜂毒液及其它抑制寄主免疫因子对寄主血细胞的影响

Table 1-3 Effects of venom and other hosts immune inhibiting factors on hemocytes of hosts

Parasitoid/host	Immune factors	Hemocytes		Spreadig, number and morphology	Reference
		Encapsulation			
		Egg or larvae of parasitoid	Non-self		
<i>Apanteles glomeratus</i> / <i>Pieris rapae crucivora</i>	CF	有			Kitano , 1982; 1986; Wago& Kitano, 1985
	V	5 d 后包裹率 30%	1 h ~ 2 d 后, 包裹率 80%	对血细胞形态无影响	
	CF/V	24 ~ 48 h 后, 无; 5 d 后, 包被率 30%	1 h ~ 2 d 后, 有包裹		
<i>Campoletis sonorensis</i> / <i>Heliothis virescens</i>	PDV			注射后 24h, THC 不受影响, PL 减少	Davies <i>et al.</i> , 1987
	V			THC 和 PL 均不受影响	
	CF/V			注射后 24h, THC 和 PL 均减少	
<i>Chelonus inantius</i> / <i>Spodoptera littoralis</i>	CF/V	无	有	对血细胞的延展性和 THC 无影响	Steiner <i>et al.</i> , 1999
<i>Cotesia kariyai</i> / <i>Pseudaletia separata</i>	CF	有	4d 后,包裹率 50%		Strand&Pech, 1995
	V		4d 后, 有包裹		
	CF/V		4d 后,包裹率 15%	PL 延展性消失	
<i>Cotesia melanoscela</i> (Cm)& <i>Hyposter spp</i> (H)/ <i>Orgyia leucostigma</i>	CF	2 h~1 d 后, H 卵无包被			Guzo&Stoltz, 1987
	CF/V	H 卵无包被			
	失活的 PDV 和 V	H 卵无包被, 幼虫有包被			
<i>Microplitis demolitor</i> / <i>Pseudoplusia includens</i>	CF	无	无		Strand&Noda, 1991; Strand&Pech, 1995
	V	包被率 75%	包被率 75%	均不受影响	
	CF/V	无	无	GR 和 PL 延展性降低, THC 增加, DHC 不受影响	
	PDV/V	无	无	PL 和 GR 降低, GR 发生程序化死亡	
<i>Pimple hypochondriaca</i> / <i>Lacanobia oleracea</i>	V	包被率下降			Marris <i>et al.</i> , 1999
<i>Pteromalus puparum</i> / <i>Pieris rapae</i>	V	36h 后, 包被率为 29.6%		PL 延展性丧失	Cai <i>et al.</i> , 2004
<i>Tranosema rostrale</i> / <i>Choristoneura fumiferana</i>	CF			THC 减少	Doucet& Cusson, 1996
	V			THC 不受影响	
	CF/V			THC 减少	

PL: Plasmacyte 浆血细胞; GR: Granular hemocyte 颗粒血细胞; PDV: Polydnavirus 多分 DNA 病毒;

CF: Calyx fluid 萼液; V: venom 毒液; THC: Total hemocyte count 血细胞的总数; DHC: Differential hemocyte count 各种血细胞数。

粘虫绒茧蜂 *Apanteles kariyai* (Tanaka *et al.*, 1987; Wani *et al.*, 1990)、红足侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* (Tanaka & Vinson, 1991; Gupta & Ferkovich, 1998) 及棉长管蚜茧蜂 *Aphidius ervi* (Digilio *et al.*, 1998), 它们的毒液、毒液或二者的混合物可减缓寄主的生长、抑制寄主化蛹。外寄生蜂 *Euplectus comstockii* 毒液通过调控粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 幼虫体内蜕皮激素的水平来抑制其发育, 且外加保幼激素、蜕皮激素、20 羟-蜕皮酮均不能解除这种抑制作用, 其中毒液活性组分为 66 kDa 的蛋白, 纳克级此蛋白即可有足够生理活性, 此蛋白对温度、有机溶剂、酸度及蛋白酶均比较敏感 (Coudron & Brandt, 1996); 另一种是早熟变态型, 如甲腹茧蜂 *Chelonus* sp. 的胚胎、毒液及毒液可引起粉纹夜蛾幼虫的早熟变态 (Jones & Wache, 1998)。且在以上两种类型中, 毒液对毒液起协同促进的作用。

索诺齿唇茧蜂 *Campoletis sonorensis* 的 PDV 的基因与其毒液蛋白的基因有同源序列, 二者的多抗也有相同的抗原决定簇, 这可能是在进化过程中, PDV “捕获”了毒液蛋白的基因, 或毒液模拟了 PDV 的结构蛋白, 故毒液有种类的特异性, 一种寄生蜂的毒液和另一种寄生蜂的 PDV 不能起到同种 PDV 和毒液所起到的生理效应 (Webb & Summers, 1990), 如黑头折脉茧蜂抑制寄主的化蛹需要毒液的协同作用, 当毒液注射到烟芽夜蛾 *H. virescens* 5 龄第 3 d 的幼虫体内后, 幼虫化蛹受到抑制或形成幼虫-蛹中间型。而黑头折脉茧蜂的毒液与红足侧沟茧蜂或齿唇姬蜂的毒液混合物则不能抑制寄主化蛹 (Tanaka & Vinson, 1991)。

3.3 调节寄主的内分泌

寄生蜂毒液与毒液、畸形细胞或幼蜂的混合物可降低寄主体内蜕皮激素和保幼激素的滴度, 如近曲斑甲腹茧蜂 (Jones *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1999)、甲腹茧蜂 (Brown & Friedländer, 1995; Grossniklaus-Bürgin *et al.*, 1998); 毒液单独也可使寄主体内抑制蜕皮激素的分泌或使其分泌高峰推迟 (Weaver *et al.*, 2000); 抑制寄主前胸腺的活动、使之解离或诱导细胞凋亡 (Tanaka & Vinson, 1991); 降低寄主前胸腺的感受性, 使之对 PTTH 的反应变得不敏感, 如黑头折脉茧蜂的毒液和蜂毒注射到烟芽夜蛾幼虫体内后, 幼虫前胸腺的功能受到抑制, 促前胸腺激素 (PTTH) 的反应能力也受到抑制, 在幼虫到蛹发育过程中, 只产生一个蜕皮甾类的峰, 未被寄生和被寄生的烟芽夜蛾幼虫均可对 PTTH 产生反应, 而此峰产生之后, 只有未被寄生的烟芽夜蛾的前胸腺细胞才能对 PTTH 的刺激产生反应, 释放蜕皮甾类 (Steiner, *et al.*, 1999)。Marris 等 (2000) 综述了外寄生蜂与其寄主内分泌的相互关系, 其中包括 Eulophidae (*Eutophus* spp., *Euplectrus* spp.), Eupelmidae (*Euplemus* spp.), Pteromalidae (*Catolaccus* sp., *Nasonia* sp.) 和 Megaspilidae (*Dendrocerus* sp.), 更深入地解释了寄生蜂对寄

主内分泌的调控作用。

3.4 营养调控

寄生蜂毒液在对寄主体内营养物质进行调控作用前人已有较多研究。如 Rivers 和 Denlinger (1995) 的研究表明, 麻蝇 *Sarcophaga bullata* 预成虫被丽蝇蛹集金小蜂蛰刺 (Envenomated, 寄生后去除寄生蜂卵) 后, 血淋巴和脂肪体中脂类含量均下降, *Phormia regine* 血淋巴中脂类含量升高, 脂肪体中脂类含量下降, 家蝇 *Musca domestica* 血淋巴中脂类含量变化不大, 而脂肪体中脂类含量升高, 麻蝇 *S. stemodontus* 血淋巴和脂肪体中脂类含量均下降, 而注射毒液对麻蝇 *S. bullata* 可引起与蛰刺相似的生理效应, 一方面说明, 不同寄生蜂对寄主的营养调控有其特异性, 另方面也说明, 同一种寄生蜂对不同寄主营养调控方式也有不同。Nakamatsu 和 Tanaka (2003 a) 的研究表明, 粘虫 *Pseudaletia separate* 被 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 寄生后, 血淋巴中蛋白和脂类含量显著升高, 而脂肪体中二者含量在后期显著降低, 注射 0.3 VRE 毒液可产生与寄生相似的生理效应, 但注射毒液后寄主血淋巴中蛋白和脂类的含量与寄生相比升高; 脂肪体内二者含量与寄生的相比无显著差异, 进一步研究表明, *P. separate* 血淋巴中脂类含量的升高是由 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 毒液引起脂肪体细胞分解所致 (Nakamatsu & Tanaka, 2004)。Rivers (2004) 研究 2 种秽蝇与 8 种寄生蜂关系时发现, 所有单寄生蜂毒液均可导致蝇类于 24 h 内死亡, 而聚寄生蜂只能抑制蝇类的发育, 并能引起寄主血淋巴中脂类浓度的升高, 且 *Nasonia longicornis* 和 *Muscidifurax raptorellus* 寄生后, 脂类含量与寄主体内寄生蜂种群大小呈正相关。*Euplectrus comstockii* 和 *Euplectrus plathypenae* 的自然寄主幼虫早期被蛰刺后, 可刺激贮藏蛋白在末龄幼虫血淋巴中表达量的增加, 幼虫末期被蛰刺后, 血淋巴中贮藏蛋白含量则显著下降, 因此毒液对自然寄主血淋巴中贮藏蛋白的调节是双向的, 但毒液对非自然寄主昆虫体内贮藏蛋白合成则无调节作用 (Brandt *et al.*, 1996)。

3.5 抑制寄主生殖系统的发育

寄生蜂毒液和其它抑制寄主免疫因子相互作用可引起寄主生殖系统的变化, 在含有 PDV 的寄生蜂中, PDV 起主要作用, 毒液对 PDV 起一定的增效作用。如粘虫绒茧蜂 *Cotesia kariyai* 的 PDV 和毒液可抑制粘虫 *Pseudaletia separata* 精巢的发育 (Tanaka, *et al.*, 1994), 革腹茧蜂 *Ascogaster quadriden* 假寄生可抑制苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 精巢精子细胞的发育 (Brown & Friedländer, 1995), 甲腹茧蜂的 PDV 和毒液可使其寄主去势 (Jones, 1996), 粘

虫绒茧蜂的毒液和 PDV 一起注射入 4 龄初的粘虫幼虫体内可观察到粘虫精巢中出现变异染色体,而且数量还会随时间增加(Tagashira & Tanaka, 1998)。但集聚绒茧蜂 *Cotesia congregata* 的 PDV 和毒液可推迟烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫的漫行期,从而形成比对照大的精巢(Reed & Beckage, 1997)。某些寄生蜂的毒液对雌性寄主卵巢的发育也有影响,如蚜茧蜂 *Aphidius ervi* 的毒液可引起豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 顶端卵巢细胞的变异,24h 后,寄主卵巢细胞的核仁消失,细胞核周围出现电子致密物(electron-dense material),通常称为“nuage 物质”;48h 后,细胞内物质变质,可能引发细胞的程序化死亡(Digilio *et al.*, 2000)。

3.6 麻痹作用及对神经传导的阻断

多数外寄生蜂产卵时注射的毒液对寄主有长久麻痹作用(Doury *et al.*, 1995)。内寄生蜂毒液很少有麻痹性,被寄生寄主一般可继续发育。东方旋小蜂 *Eupelmus orientalis* 的螫刺能诱导寄主停止发育和永久麻痹(Doury *et al.*, 1995),肿腿蜂 *Laelius pedatus* 的毒液可使多数谷斑皮蠹 *Trogoderma granarium* 幼虫完全麻痹,而巨颅金小蜂 *Catolaccus grandis* 寄生象甲时,非麻痹寄主的比例与雌蜂年龄成正比。具麻痹性的寄生蜂毒液主要作用于寄主的中枢神经系统或神经-肌肉系统,因昆虫体内的此系统存在相似的生理反应机制,故麻痹性毒液可作用于较广泛种类。毒液可通过改变钠离子通道的细胞分裂素影响寄主烟碱突触传递的兴奋性,从而影响其神经信号的传导(Piek, 1990),还可通过使神经节失活来抑制寄主神经信号的传导。*Habrobracon hebetor* 毒液可使寄主麻痹,但对心脏和中肠功能无任何影响,说明毒液特异性地作用于体壁肌肉系统(Beard, 1952),Spanjer 等(1977)和 Visser 等(1983)已经成功分离出 43.7 和 56.7 kDa 活性蛋白,此 2 个蛋白组分与毒液蛋白的功能,仅在剂量依赖关系方面不同;瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriac* 毒液中的 22 kDa 蛋白,可引起家蝇成虫的麻痹(Parkinson & Weaver, 1999)。

4 寄生蜂毒液应用前景展望

寄生蜂的毒液在害虫生防、药理学和生理学研究中均有广阔的应用前景。例如,瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液可提高番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 幼虫对蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 和白僵菌 *Beauveria bassiana* 的敏感性(Dani *et al.*, 2004);微孢子虫对寄生蜂 PDV 和毒液处理的昆虫有更好的杀虫效果(Hoch & Schopf, 2001);寄生蜂毒液可提高寄主昆虫对杆状病毒的敏感性(Coudron *et al.*, 1999)。这些均说明寄生蜂的免疫抑制因子可通过抑制寄主免疫系统,提高其它生防物的作用效果。鉴于蝎子、蜘蛛和社会性膜翅目昆虫

中毒腺分泌的碱性蛋白研究已有成果,结合现代生物技术,寄生蜂的毒液将比寄生蜂的其它抑制寄主免疫因子或调控寄主生长发育因子更容易地应用于害虫防治(如PDV基因组是以多个大小不一的DNA片段组成,并整合于寄生蜂的基因组中,它的应用不及毒液蛋白容易)。如今,蝎子毒液基因已经成功地应用于构建重组杆状病毒杀虫剂和培育转基因抗虫作物(Possee *et al.*, 1993; Regev *et al.*, 2003),但这类毒素有神经麻痹作用,生态和食品安全的风险较大,相比之下,寄生蜂的毒液在这方面更合适,因为大多数寄蜂毒液蛋白不同于蝎子等的毒液蛋白,系分子量较大的酸性蛋白,仅能抑制寄主免疫和调控寄主的发育或仅对寄主昆虫有神经麻痹作用,因此,此种毒液蛋白的基因在抗虫作物培育和基因工程微生物杀虫剂研制方面对生态和食品的安全性更高,是一种安全、合适的“候选基因”,希望在转基因抗虫作物研究领域发挥更大作用(Beckage & Gelman, 2004)。

第二部分 试 验 研 究

第二章 蝶蛹金小蜂成蜂生殖系统抑制寄主细胞免疫因子的确定

寄生蜂突破寄主免疫的策略有主动抑制和被动逃避两种方式 (Strand & Pech, 1995)。主动抑制涉及的因子主要包括雌蜂产卵过程中携带的毒液 (Venom)、多分 DNA 病毒 (Polydnavirus, PDV)、类病毒颗粒 (Virus like particle, VLP) 和卵巢蛋白 (Ovary protein, OP) 及胚胎发育过程产生的畸形细胞 (Teratocyte) 和幼虫分泌物等 (Dahlman *et al.*, 1990; Vinson, 1990; Fleming, 1992; Asgari & Schmidt, 1994; Shelby & Webb, 1994; 1997; 1999; Jones, 1996; Luckhart & Webb, 1996; Beckage, 1998; Vinson *et al.*, 1998; 叶恭银 & 胡萃, 1998; Kinuthia *et al.*, 1999; 秦启联, 2000; 蔡峻等, 2000; 2001; 2002; Cai *et al.*, 2001; 2004; 尹丽红, 2001; 白素芬等, 2003; Zhang *et al.*, 2004 a); 被动逃避过程中, 寄生蜂可选择产卵于寄主血细胞不能抵达的部位或寄主组织内 (Kraaijeveld & van Alphen, 1994; Eslin & Prévost, 2000), 或者通过卵表面的分子拟态来逃避寄主的免疫反应 (Davies & Vinson, 1986; Asgari & Schmidt, 1994; Hayakawa & Yazaki, 1997; Asgari *et al.*, 1998; Kinuthia *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2003)。就某一特定寄生蜂而言, 其采用策略或涉及的主动抑制因子是因种而异, 就蝶蛹金小蜂而言, 毒液具抑制寄主细胞免疫的功能 (蔡峻等, 2001; 2002; Cai *et al.*, 2004), 而以上研究并未排除蝶蛹金小蜂生殖系统其它组分的影响, 故本章研究蝶蛹金小蜂成蜂生殖系统各组成部分对寄主血细胞的影响, 为明确抑制寄主细胞免疫的主要因子及作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂系实验室种群, 自 1998 年于人工气候室内 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 75%, L:D = 14:10 h) 饲养至今。菜粉蝶采自杭州郊区, 成虫置室外放有盆栽甘蓝的四周覆盖 80 目尼龙纱的产卵笼 ($3\text{ m} \times 2\text{ m} \times 3\text{ m}$) 内产卵, 任所产卵于甘蓝叶片上孵化。幼虫孵化后仍留在盆栽甘蓝上取食, 生长至 3 龄时收集到人工气候室内继续以甘蓝叶片饲养, 直至化蛹。所用甘蓝及其叶片均移栽或采至不用任何化学农药的网室大棚内。

蝶蛹金小蜂始终饲养繁育于上述条件人工气候室内。羽化后, 成蜂按 1:2 的雌雄比转移至附有一个蘸透 20% 蜂蜜水的脱脂棉球的“子弹型”大玻管中, 管口扎以纱布, 任其取食、交配, 3 d 后用于接蜂。接蜂时, 先把化蛹 12 h 内的菜粉蝶蛹放入 $1.8\text{ cm} \times 8.2\text{ cm}$ 的指形管内, 每管 1 头, 然后接入羽化后 3 d 且已集中交配过的雌蜂 1 头, 以棉花塞口, 观察并

形管内，每管 1 头，然后接入羽化后 3 d 且已集中交配过的雌蜂 1 头，以棉花塞口，观察并标记被寄生的蛹，待子蜂羽化。

柑桔凤蝶幼虫采自浙江黄岩桔园中，在上述条件人工气候室内饲以新鲜嫩桔叶，待幼虫化蛹后，用于接蜂。接蜂方法同菜粉蝶蛹。

1.2 寄生蜂成蜂生殖系统各部分的解剖

取羽化后 3 d 的雌蜂置 Olympus 解剖镜下，用尖嘴镊拉出其生殖系统（图 2-1 A），取下卵巢、卵子（30 粒）、输卵管及毒囊，羽化后 3 d 的雄蜂解剖附腺及睾丸（图 2-1 B），分别移至冰浴并含有一定体积 TBS 缓冲液（50 mmol/L Tris, 307 mmol/L NaCl, 1 N HCl 调节 pH 至 7.4）的 Eppendorf 离心管中。冰浴中研磨后，4℃ 10000 rpm 离心 10 min，取上清，即得生殖系统各组成部分粗提液，雌蜂输卵管分别以解剖针刺破后，收集流出液。尔后，以 TBS 缓冲液调节各组成部分的浓度，使每 1 μ l TBS 缓冲液中分别含有 1 个生殖系统各组成部分当量的蛋白，置 -70℃ 保存备用或立即用于实验。

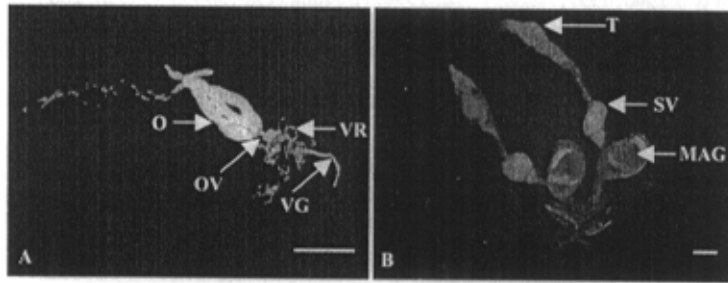


图 2-1 蝶蛹金小蜂雌蜂 (A) 和雄蜂 (B) 生殖系统图

Fig 2-1 Female (A) and male (B) reproductive system of *Pteromalus puparum*

O: 卵巢 Ovary; OV: 输卵管 Oviduct; VR: 毒囊 Venom reservoir; VG: 毒腺 Venom gland; SV: 贮精囊 Seminal vesicle; T: 睾丸 Testis; MAG: 雄性附腺 Male accessory gland. 标尺代表 1 mm。

1.3 对血细胞延展和存活影响的测定

以 75% 酒精消毒化蛹后 1 d 的菜粉蝶或柑桔凤蝶蛹体表，于无菌操作台内采集血淋巴，置于含少量苯基硫脲的 Eppendorf 离心管中，再各取 50 μ l 分别加到每孔含 198 μ l 的 TC100 昆虫细胞培养液（含 10% 胎牛血清）的 96 孔细胞培养板的各孔穴中。尔后，将成蜂生殖系统各部分提取液按 2 μ l 的量分别加入 3 个不同孔穴中。设仅加 2 μ l TBS 缓冲液为对照。接着，置 27℃ 细胞培养箱中培养，分别于 0.5 和 4 h 后置 Leica 倒置显微镜下任选 3 个视野观察、考查各处理孔穴中延展和未延展（图 2-2）的血细胞数量，并计算两种血细胞的延展率。其

中, 延展率 (%) = 延展的血细胞数量/考查的血细胞的总数量 $\times 100$ 。同时, 以 Eppendorf 微量移液器吸出各处理孔穴中的血细胞悬浮液, 加等体积的 0.04% 台盼蓝溶液混匀, 室温放置 10 min 后, 以血球计数板于 Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色 (死亡) 和未被染色 (存活) 的血细胞的数量, 计算血细胞死亡率。

1.4 对血细胞包裹作用影响的测定

参照方法 1.3, 将菜粉蝶或柑桔凤蝶蛹血细胞加入含 TC100 昆虫细胞培养液的 48 孔细胞培养板孔穴中; 再将生殖系统各组成部分提取液按 2 μl 的量分别加入 3 个不同孔穴中, 使孔穴中毒器官组均为 0.008 当量/ μl ; 最后在每个孔穴中加入 10 粒 Sephadex A-50 微珠, 置 27 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养。同时设加 2 μl TBS 和 10 粒 Sephadex A-50 微珠的作对照。分别于培养后 0.5 和 4 h, 置 Leica 倒置显微镜下考查各处理孔穴中不同包裹级别的 Sephadex A-50 微珠粒数, 计算包裹指数, 其中, 包裹指数 (%) = $[\sum (\text{某一包裹级数} \times \text{该包裹级别的 Sephadex A-50 微珠数目}) / (\text{供试 Sephadex A-50 微珠的总数} \times 5)] \times 100$ 。包裹的程度可依据 Sephadex A-50 微珠表面覆盖的血细胞量及包裹层厚度而分成 5 级, 其中, 1 级: 微珠表面仅有少数血细胞 (<10 个); 2 级: 微珠未被血细胞完全包裹; 3 级: 微珠恰好被血细胞完全包裹; 4 级: 血细胞完全包裹微珠, 但包裹层厚度小于微珠半径; 5 级: 血细胞完全包裹微珠, 且包裹层厚度大于微珠半径 (图 2-3)。

1.5 寄生次数对蝶蛹金小蜂卵被包裹率的影响

蝶蛹金小蜂羽化后雌雄分开, 一部分雌蜂交配, 另一部分雌蜂不交配, 20% 蜂蜜水饲养 3 d 后, 用于试验。以交配过雌蜂寄生菜粉蝶蛹, 于寄生后 4 h 解剖菜粉蝶蛹, 计数被血细胞包裹和未包裹的蝶蛹金小蜂卵, 并统计卵的被包裹率, 利用后的雌蜂分成 2 部分, 一部分进行再交配, 另部分不进行再交配, 20% 蜂蜜水饲养 1 d, 寄生菜粉蝶蛹, 考查以上各指标; 再交配的蜂分成两组, 20% 蜂蜜水饲养 1 d, 分别进行交配和不交配处理, 考查以上各指标。未进行交配的雌蜂作同样处理。

2 结果

2.1 生殖系统各组成部分对两种寄主血细胞的影响

由图 2-4 可以看出, 蝶蛹金小蜂卵巢、卵子、输卵管、睾丸、雄性附腺提取物处理寄主菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹血细胞后, 细胞延展率均大于 85%, 死亡率均小于 20%, 对 Sephadex

A-50 微珠的包裹指数处理后 0.5 h 均大于 40%，处理后 4 h 则高于 55%，与对照相比无显著差异。而以雌蜂毒液处理后，两种血细胞的延展率均小于 20%，细胞死亡率大于 30%，对 Sephadex A-50 微珠的包裹指数小于 35%，显著低于对照。可见，蝶蛹金小蜂毒液是抑制寄主血细胞免疫的主要因子。

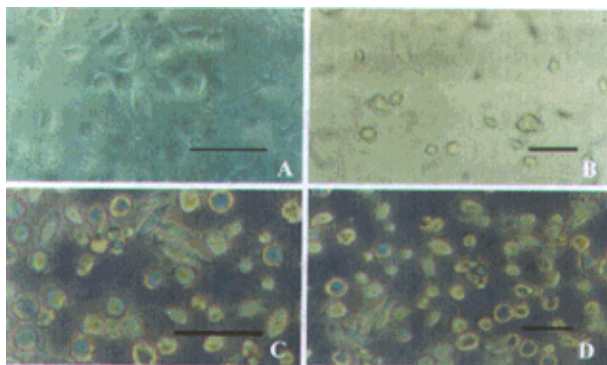


图 2-2 菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞毒液处理前后形态变化

Fig. 2-2 Changes in the micrographs of pupae hemocytes from *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* after treatment with *Pteromalus puparum* venom

A, B: 毒液处理前后的菜粉蝶血细胞; C, D: 毒液处理前后柑桔凤蝶的血细胞。标尺代表 10 μm.
A, B: *Pieris rapae* hemocytes treated with or without *Pteromalus puparum* venom; C, D: *Papilio xuthus* hemocytes treated with or without *Pteromalus puparum* venom. Scale bar = 10 μm.

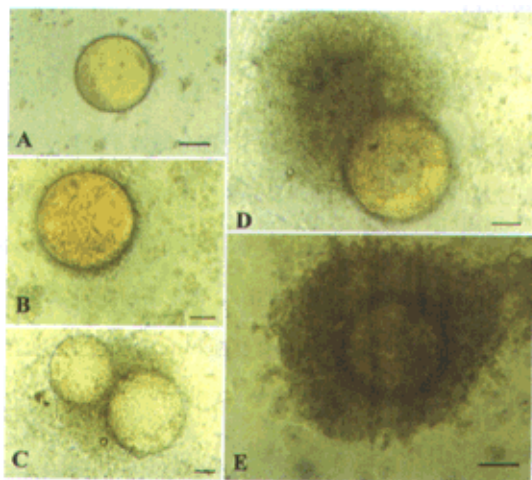


图 2-3 不同包裹级别的 Sephadex A-50 微珠 - 菜粉蝶血细胞复合体的显微形态

Fig. 2-3 Micrographs of the complex of Sephadex A-50 beads and *Pieris rapae* hemocytes with different encapsulated grades

A~E 分别示 1、2、3、4 和 5 包裹级别; 标尺代表 10 μm. A, B, C, D and E: Showing the complex of beads and hemocytes with the encapsulated grade of 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. Scale bar = 10 μm.

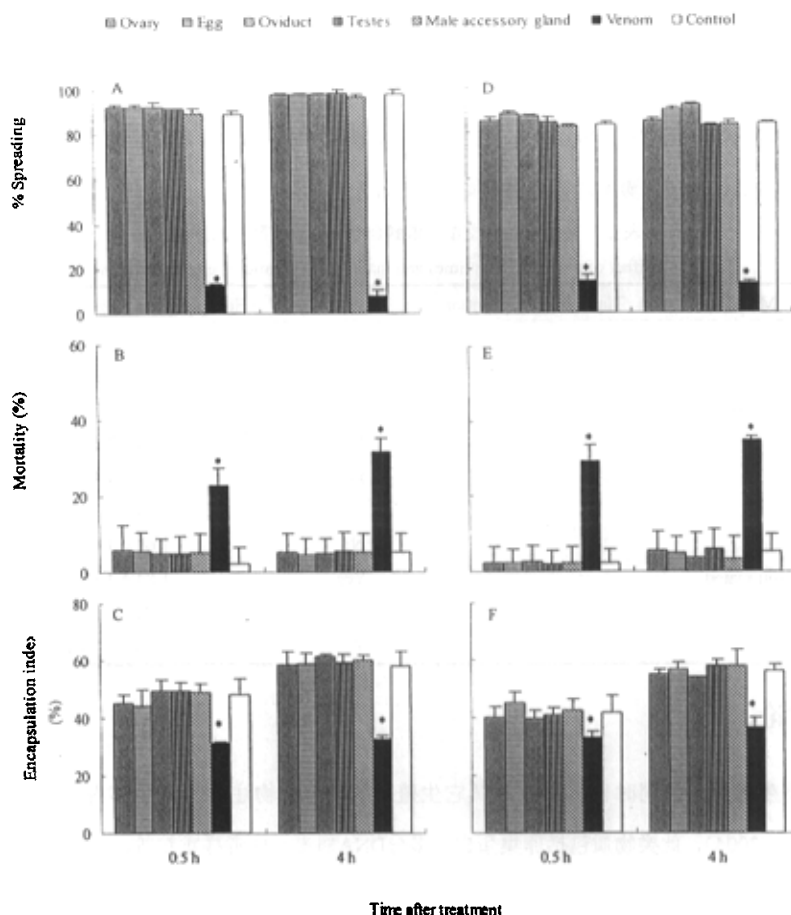


图 2-4 蝶蛹金小蜂成蜂生殖系统各主要组成部分提取物对菜粉蝶及柑桔凤蝶蛹血细胞的影响

Fig. 2-4 Effects of the extracts from different major apparatus from the reproductive system of *Pteromalus puparum* on the hemocytes from *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* pupae

A, B, C 分别为处理后菜粉蝶蛹血细胞的延展率、死亡率及对 Sephadex A-50 珠的包裹指数; D, E, F 分别为处理后柑桔凤蝶蛹血细胞的延展率、死亡率及对 Sephadex A-50 珠的包裹指数。*代表与对照差异显著($P < 0.05$)。A, B and C mean the spreading percentage, mortality and encapsulation capable of hemocytes from *Pieris rapae* pupae after venom treatment, respectively; D, E and F mean the spreading, mortality and encapsulation capable of hemocytes from *Papilio xuthus* pupae after venom treatment, respectively. * Represents significantly different by comparison with the control ($P < 0.05$).

2.2 寄生次数对蝶蛹金小蜂卵被包裹率的影响

雌蜂首次所产卵与第2次所产卵 ($F = 0.97, P = 0.34$) 和3次 ($F = 0.85, P = 0.59$) 被寄主血细胞包裹的比率相互间无显著差异, 即雌蜂产卵次数对蜂卵的被包裹率无显著影响。交配对蜂首次所产卵 ($F = 0.29, P = 0.60$)、第二次产卵 ($F = 0.14, P = 0.71$) 和第三次产卵 ($F = 0.00, P = 0.99$) 被包裹率均无显著影响 (表 2-1)。

表 2-1 寄生次数和交配对蝶蛹金小蜂卵被包裹率的影响

Table 2-1 Effect of parasitization times and mating on the ratio of egg encapsulation

Mated	Times of parasitization	Remated	Encapsulation ratio of eggs (%)
Mated	1	-	0.56 ± 0.90 a
	2	No	1.54 ± 1.99 a
		Yes	1.84 ± 1.86 a
	3	No	2.16 ± 2.65 a
		Yes	2.91 ± 4.45 a
	1	-	0.84 ± 1.04 a
Non-mated	2	No	1.62 ± 1.63 a
		Yes	1.84 ± 1.86 a
	3	No	2.74 ± 2.26 a
		Yes	2.78 ± 2.78 a

3 讨论

寄生蜂产卵的同时也将毒液及其它生殖系统的分泌物注射到寄主体内 (Beckage & Gelman, 2004), 此类物质包括卵巢蛋白、多分DNA病毒及病毒样颗粒等。与那些具膨大卵萼 (其中携带多分DNA病毒) 的姬蜂和茧蜂相比, 蝶蛹金小蜂雌蜂的卵巢基部无膨大卵萼 (图2-1A), 故不可能含有多分DNA病毒。其卵巢、卵子、输卵管及雄蜂来源的睾丸、附腺对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞的形态、存活及行为无任何影响, 而雌蜂毒液则可显著抑制血细胞的延展及包裹反应, 并导致血细胞的死亡 (图2-4), 故可认定蝶蛹金小蜂毒液是抑制寄主血细胞免疫的主要因子, 这与瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 及丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的情形相似 (Richard & Edwards, 1999 a, b; Parkinson *et al.*, 1999; 2001; 2002; Richard & Parkinson, 2000 a, b)。而蝶蛹金小蜂成熟卵表面蛋白与菜粉蝶血细胞有相同的抗原决定簇, 也可通过分子拟态被动逃避寄主的细胞免疫 (Cai *et al.*, 2004), 因此可以推测, 在蝶蛹金小蜂产卵后短时间内 (< 0.5 h), 可能通过卵表蛋白的被动逃避寄主的细胞免疫系统, 毒液的主动抑制也起一定作用, 随着时间的推移, 毒液的主动抑制可能起主导作用, 直至寄生蜂幼虫孵化。但具体是否如此, 还得进一步验证。

蝶蛹金小蜂雌蜂产卵次数和交配对蜂卵的被包囊率均无显著影响（表 2-1），说明多次寄生（至少 3 次）的蝶蛹金小蜂毒液仍足以抑制菜粉蝶蛹的免疫系统，并保护蜂卵不被血细胞包囊，进一步说明雄蜂来源物质对抑制寄主的免疫系统无实质性作用。

蝶蛹金小蜂抑制寄主细胞免疫的主要因子是雌蜂的毒液，故本论文接下来的研究则主要围绕蝶蛹金小蜂毒液的性质与功能展开，并与丽蝇蛹集金小蜂毒液作对比，以明确毒液在寄生蜂对寄主免疫与发育等调控中的作用。

第三章 两种金小蜂毒器官发育及其与卵子发育的关系

寄生蜂的毒器官一般由具分泌功能的腺体和具贮藏功能的毒囊两部分组成。迄今, 有关寄生蜂毒腺结构的研究主要集中于茧蜂科和姬蜂科的一些种类 (Bender, 1943; Togashi, 1963; Robertson, 1968; Edson & Vinson, 1979), 而很少涉及其它科。就金小蜂科而言, 仅 Ratcliffe & King (1969) 对丽蝇蛹集金小蜂毒腺做了观察, 并明确了其超微结构。相比之下, 有关毒器官的发育动态及其与卵子发育关系的研究则更少, 仅 Uematsu & Sakanoshita (1987) 做了这方面的尝试, 然而研究仍不系统。其实, 寄生蜂雌蜂产卵过程中伴随有毒液的注入, 故毒器官的发育与卵子发育间在时间动态上可能是密切相关的。本章就蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒腺长度、毒囊直径及毒囊中毒液蛋白含量的变化进行了研究, 明确毒器官各组成部分发育与卵子发育的内在相关性。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

菜粉蝶和蝶蛹金小蜂来源及饲养方法见第二章 1.1。

丽蝇蛹集金小蜂自室外诱集而得, 以棕尾别麻蝇 *Boettcheriaca (Sarcophaga peregrine)* 的室内种群供其寄生繁育。化蛹 2 d 内的棕尾别麻蝇蛹收集于 500 ml 装的玻璃罐头瓶中, 每瓶 100 头左右, 移入集中交配过的丽蝇蛹集金小蜂 20 头, 寄生 24 h 后, 去除寄生蜂, 被寄生的蝇蛹置人工气候室内 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, L:D = 14:10 h) 保育, 待子蜂羽化。羽化后子蜂饲养于含 20% 蜂蜜水棉球的“子弹型”大玻管中, 用于实验研究或繁衍种群。

1.2 毒腺及卵发育的测定

寄生蜂羽化后, 雌雄蜂分开, 雌蜂分别作以下处理: 喂食蜂蜜水并交配, 喂蜂蜜水未交配, 未喂蜂蜜水交配, 未喂蜂蜜水未交配。蜂蜜水浓度为 20%。自雌蜂羽化至死亡, 每日分别考查雌蜂毒腺长度、毒囊直径, 每次每处理考察 20 头雌蜂。并对喂食蜂蜜水并交配的雌蜂, 考查卵巢中各级卵子的数量。卵子的分级标准如下: 卵黄沉积部分的长度占卵室总长度的比例分成 3 个级别: I 级卵, 卵黄沉积部分 $< 1/2$ 卵室长; II 级卵, 卵黄沉积部分 $\geq 1/2$ 卵室长; III 级卵, 卵子发育成熟, 卵黄沉积部分充满整个卵室, 其中 I 级卵和 II 级卵均属未成熟卵, 而 III 级卵为成熟卵 (图 3-1, 3-2)。

考查时,先将寄生蜂雌蜂冷冻麻醉后,放于含有少量 TBS 缓冲液的凹玻片上, Olympus 解剖镜下,以尖嘴镊拉出生殖系统,小心使毒器官与其它组织分离,以测微尺分别测量毒腺长度及毒囊直径。尔后,以解剖针刺破毒囊,收集毒液,用于毒液蛋白含量测定,蛋白含量测定参照 Bradford (1976) 的方法,并以结晶牛血清白蛋白 (BSA) 作标准曲线。

1.3 统计方法

试验结果采用 DPS (唐启义和冯明光, 2002) 软件进行方差分析和 Duncan 氏多重比较的方法。

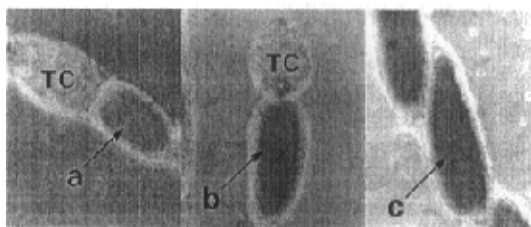


图 3-1 蝶蛹金小蜂不同发育级别卵粒的形态

Fig. 3-1 The morphology of *Pteromalus puparum* eggs with different developmental grades

a: I 级卵; b: II 级卵; c: III 级卵 (成熟卵); TC: 滋养细胞。a: Grade-I eggs; b: Grade-II eggs; c: Grade-III eggs.

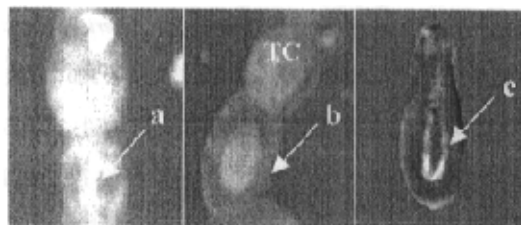


图 3-2 丽蝇蛹集金小蜂不同发育级别卵粒的形态

Fig. 3-2 Morphology of *Nasonia vitripennis* eggs with different developmental grades

a: I 级卵; b: II 级卵; c: III 级卵 (成熟卵); TC: 滋养细胞。a: Grade-I eggs; b: Grade-II eggs; c: Grade-III eggs.

2 结果

2.1 毒腺的发育

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒器官均由一个具贮存作用的毒囊、一条具分泌功能的腺体组成 (图 3-3 A 和 B)。二者的毒器官结构与 Uematsu & Sakanoshita (1987) 研究的稻

包虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus kuwanae* 及 Edson 和 Vinson (1979) 研究的 160 种茧蜂的毒器官均不相同。

2.1.1 蝶蛹金小蜂

饲以蜂蜜水并正常交配的蝶蛹金小蜂雌蜂发育过程中, 毒腺长度变化不大, 约为 2.13 ~ 2.34 mm。毒囊变化明显, 刚羽化时, 毒囊直径仅 0.13 mm 左右, 毒液蛋白含量为 0.33 μg /毒囊, 毒囊形态较瘪, 随雌蜂的发育毒囊迅速膨大, 至羽化后 2 d, 直径可达 0.24 mm, 此时毒囊比较饱满, 毒囊中毒液蛋白的含量也增加至 1.05 μg /毒囊 (图 3-4)。

交配对雌蜂毒腺长度 ($F = 0.04$, $P = 0.84$)、毒囊直径 ($F = 0.05$, $P = 0.82$) 及毒液蛋白含量 ($F = 0.009$, $P = 0.93$) 均无显著影响。喂食蜂蜜对雌蜂毒腺长度 ($F = 2.46$, $P = 0.13$) 无显著影响, 而对毒囊直径 ($F = 38.12$, $P < 10^{-4}$) 和毒液蛋白含量 ($F = 8.27$, $P = 0.007$) 均有显著正面影响 (图 3-4)。

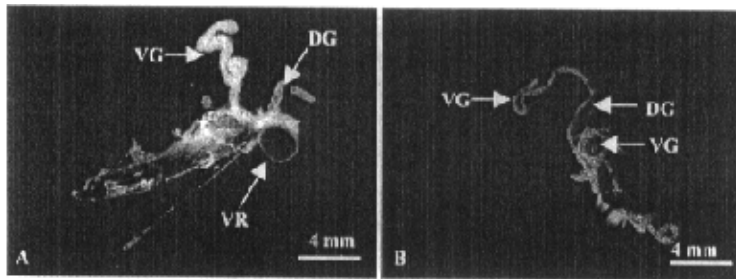


图 3-3 两种金小蜂毒器官结构图

Fig. 3-3 Venom apparatus of *Pieromalus puparum* (A) and *Nasonia vitripennis* (B)

VG: 毒腺 Venom gland; VR: 毒囊 Venom reservoir; DG: 杜氏腺 Dufour gland.

2.1.2 丽蝇蛹集金小蜂

饲以蜂蜜水并正常交配的丽蝇蛹集金小蜂雌蜂发育过程中, 毒腺长度无显著变化, 约为 3.1 ~ 3.3 mm。毒囊变化明显, 雌蜂刚羽化时, 毒液囊直径约为 0.1 mm, 发育至雌蜂羽化后第 3 d, 其直径可达 0.2 mm 左右; 毒液蛋白含量也由刚羽化时 0.17 μg /毒囊增加到合成高峰时的 0.60 μg /毒囊 (图 3-5)。

交配对雌蜂毒腺长度 ($F = 0.00$, $P = 0.98$)、毒囊直径 ($F = 0.10$, $P = 0.75$) 及毒液蛋白含量 ($F = 0.00$, $P = 0.99$) 均无显著影响。喂食蜂蜜水对雌蜂毒腺长度 ($F = 0.94$, $P = 0.34$) 无显著影响, 而对毒囊直径 ($F = 5.30$, $P = 0.03$) 和毒液蛋白含量 ($F = 7.92$, $P = 0.008$)

却有显著正面影响（图 3-5）。

蜂蜜水还可显著延展蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂成蜂的寿命，当对成蜂饲以蜂蜜水时，其寿命分别由 5 d 和 5 d 延长至 12 d 和 10 d。

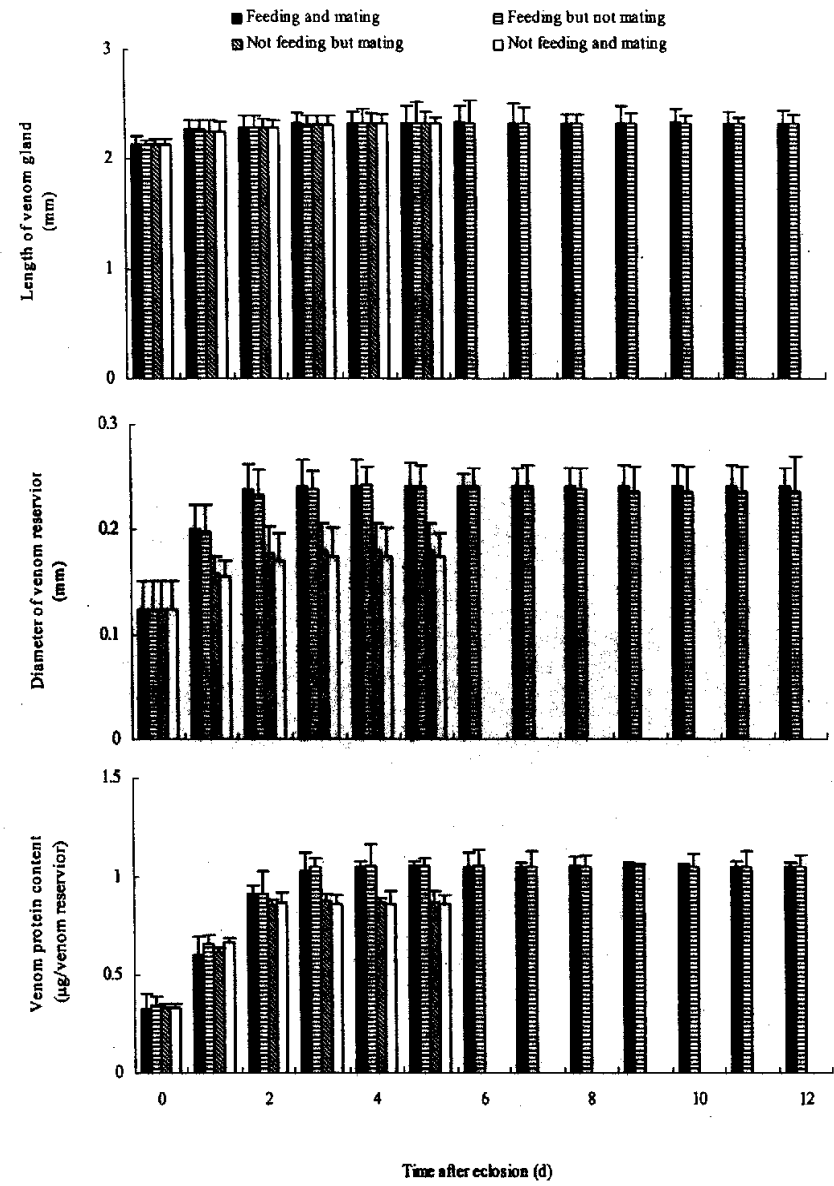


图 3-4 蝶蛹金小蜂毒器发育动态

Fig. 3-4 Development of venom apparatus from *Pteromalus puparum* females

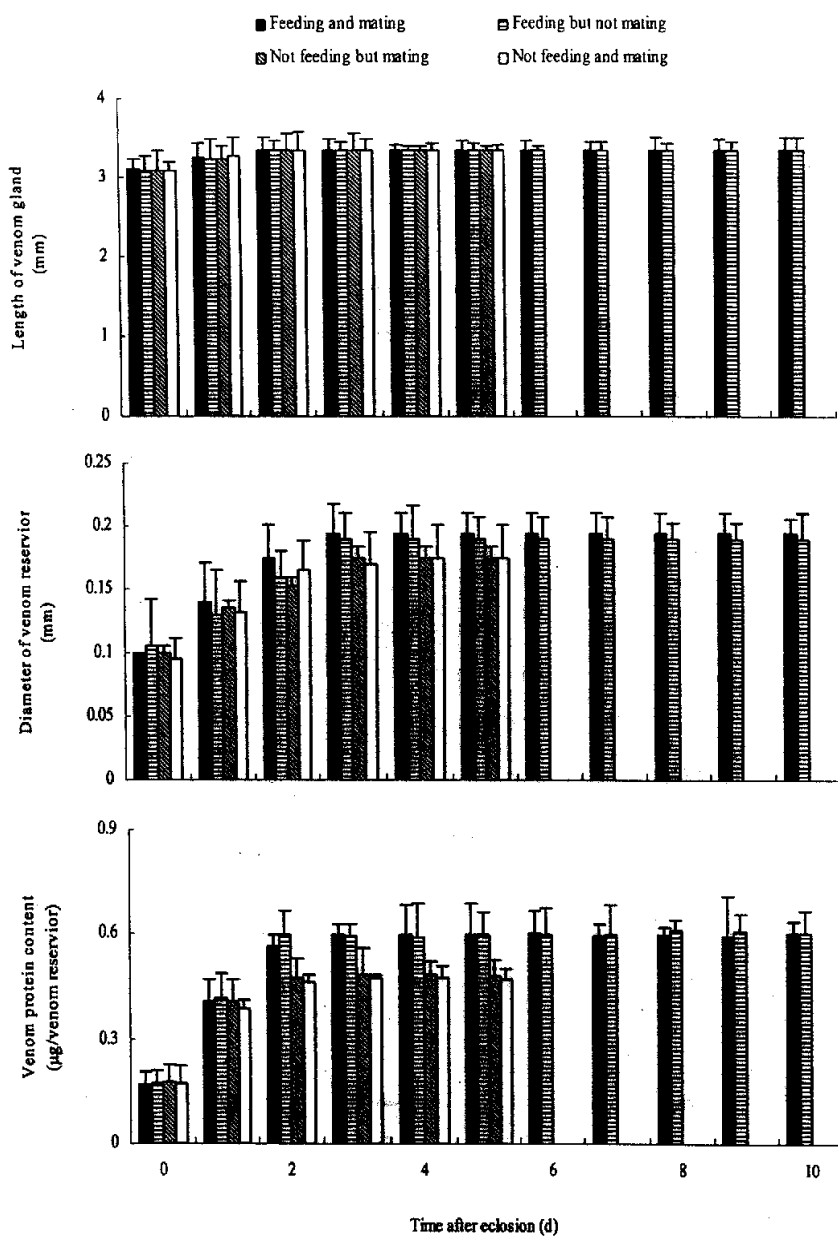


图 3-5 丽蝇蛹集金小蜂毒器官发育动态

Fig. 3-5 Development of venom apparatus from *Nasonia vitripennis* females

2.2 毒器官发育及其与卵子发育的关系

蝶蛹金小蜂毒器官各组成部分的发育与其卵巢中成熟卵的数量均成正相关, 而与其卵巢中 I 级卵和 II 级卵的数量成负相关 (图 3-6); 毒器官各组成部分之间的发育也呈现正相关关系 (图 3-7)。丽蝇蛹集金小蜂毒囊直径 ($y = 4.649 - 1.021x$, $R^2 = 0.399$, $F = 5.976$, $P = 0.037$) 与其卵巢中 II 级卵数量成负相关, 毒器官其它组分与卵巢中各级卵数量均无相关性 (图 3-8); 毒器官各组成部分之间的发育则呈正相关关系 (图 3-9)。

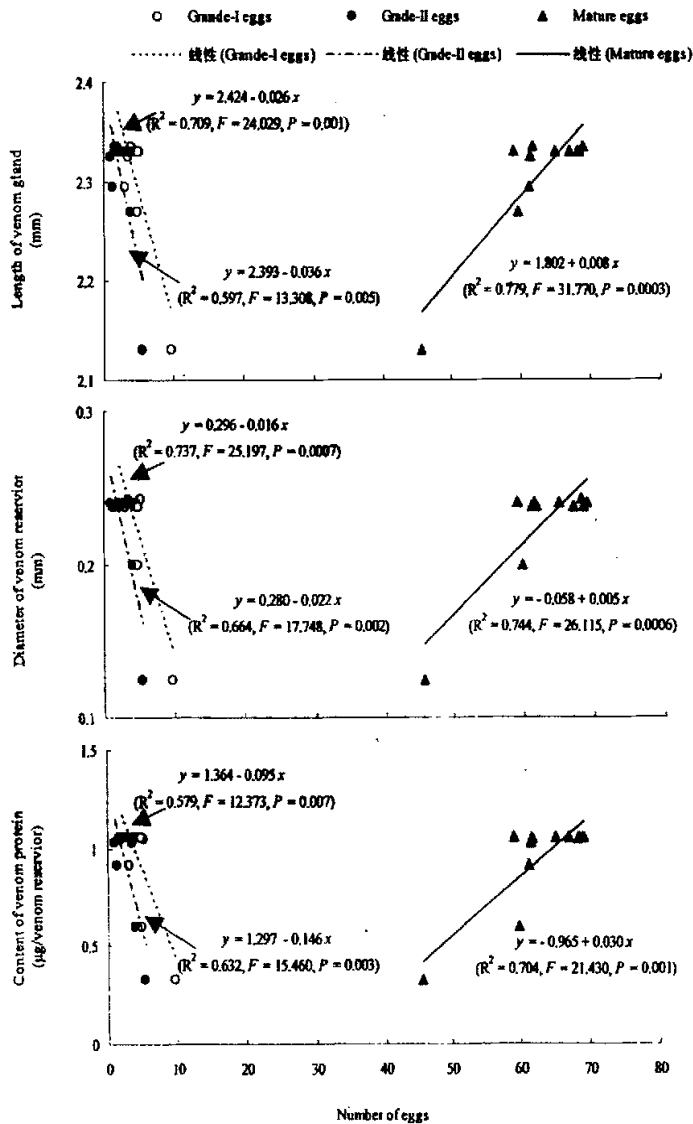


图 3-6 蝶蛹金小蜂毒器官发育与卵巢中各级卵发育的关系

Fig. 3-6 Relationships between development of venom apparatus and numbers of different developmental grades eggs in the ovaries of *Pteromalus puapurum* females

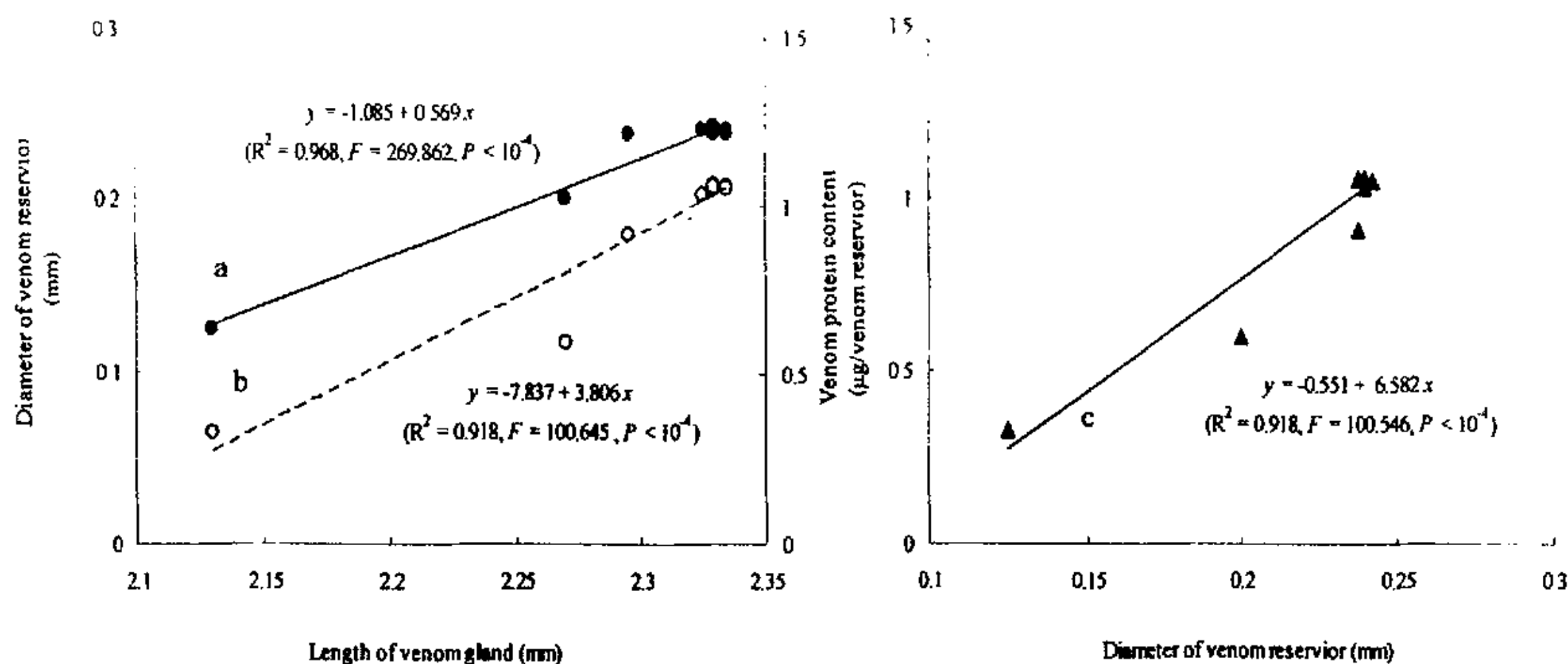


图 3-7 蝶蛹金小蜂毒器官各组成部分间发育过程中的相互关系

Fig. 3-7 Relationships among different parts of venom apparatus in female *Pteromalus puparum*

a: 毒囊直径与毒腺长度关系; b: 毒液蛋白含量与毒腺长度关系; c: 毒液蛋白含量与毒囊直径的关系。

a: Relationships between venom reservoir diameter and venom gland length; b: Relationship between venom protein content and venom gland length; c: Relationship between venom reservoir diameter and venom protein content.

3 讨论

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒器官均由一个具贮存作用的毒囊、一条具分泌功能的毒腺(图 3-3),而无稻苞虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus kuwanae* 所具有的副囊,且毒囊中也无未知功能的晶状物存在(Uematsu & Sakanoshita, 1987)。在两种金小蜂雌蜂发育过程中,毒器官各个组成部分均是在羽化后 0~3 d 发育较快,尔后稳定于某一水平,发育后期毒腺不萎缩,毒囊体积和毒液蛋白含量也无显著减少,这与稻苞虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus kuwanae* 相似(Uematsu & Sakanoshita, 1987)。

交配不能影响两种金小蜂雌蜂毒器官的发育,故未喂食蜂蜜的寄生蜂交配时雄蜂为雌蜂提供的营养远不能满足其卵子和毒器官发育之需要,提供食料(20%蜂蜜水)对毒器官和卵子的发育可产生显著有益影响。这就是寄生蜂雌蜂未交配卵也可发育成熟并产生后代,但为其提供食料(20%蜂蜜水),在延长其寿命的同时还可提高其产仔率及寄生效率的原因。在两种金小蜂雌蜂毒囊发育过程中,羽化后前 3 d 发育速度较快,以后基本稳定至某一水平,直至死亡。交配对毒器官发育无显著影响,故未交配雌蜂仍能正常寄生,并利用其毒液成功

抑制其寄主的免疫系统，保证卵的正常发育，也证明雄蜂来源的睾丸和雄蜂附腺对寄生蜂卵在寄主体内的发育无实质性影响（见第二章）。喂食蜂蜜可显著提高毒囊的发育质量，并延长成蜂寿命，在寄生性天敌繁育和释放过程中补充食料对成虫发育、提高寄生率和产仔率均至关重要。

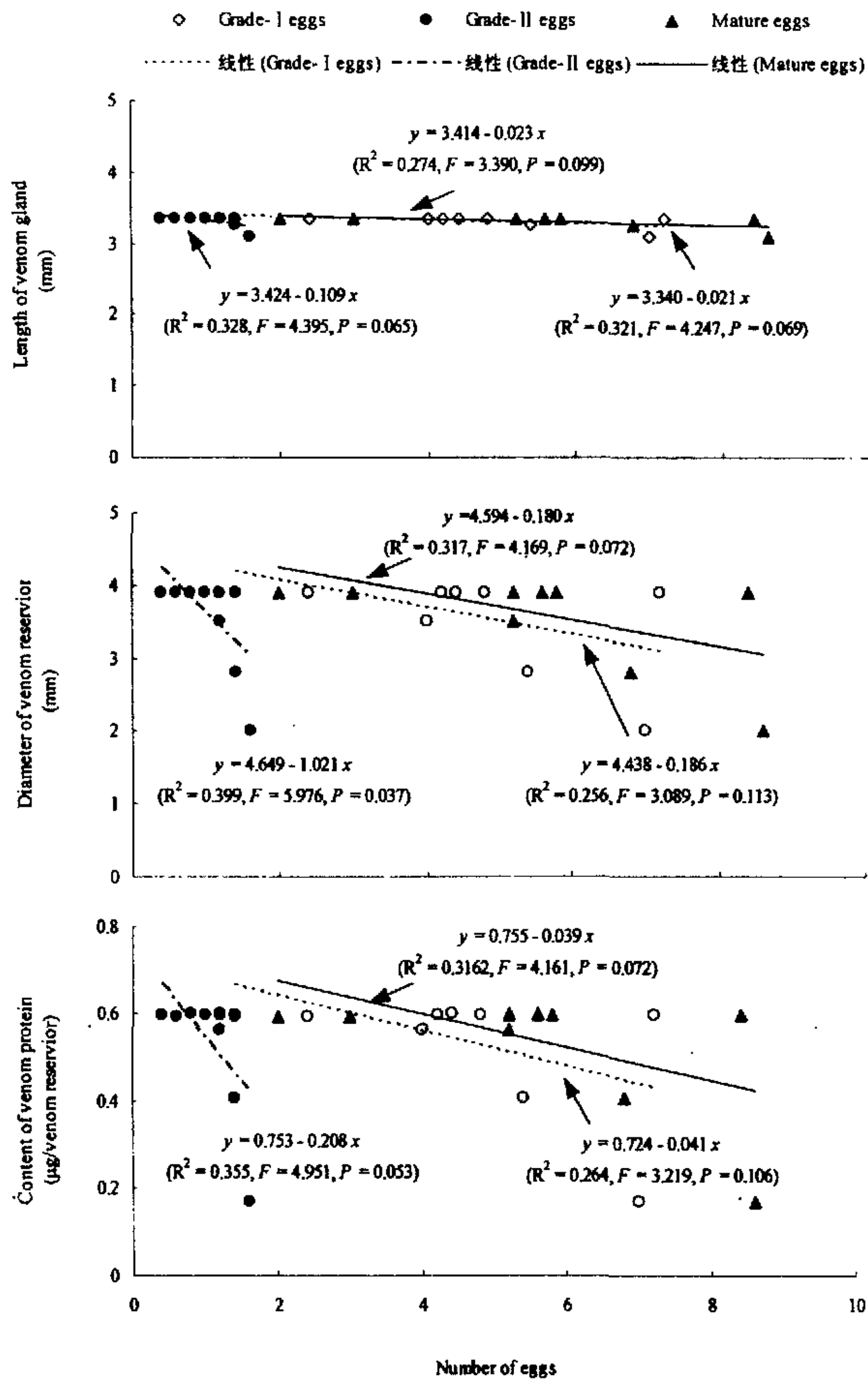


图 3-8 丽蝇蛹集金小蜂毒器官发育与卵巢中各级卵发育的关系

Fig. 3-8 Relationships between development of venom apparatus and numbers of different developmental grade eggs in ovary of female *Nasonia vitripennis*

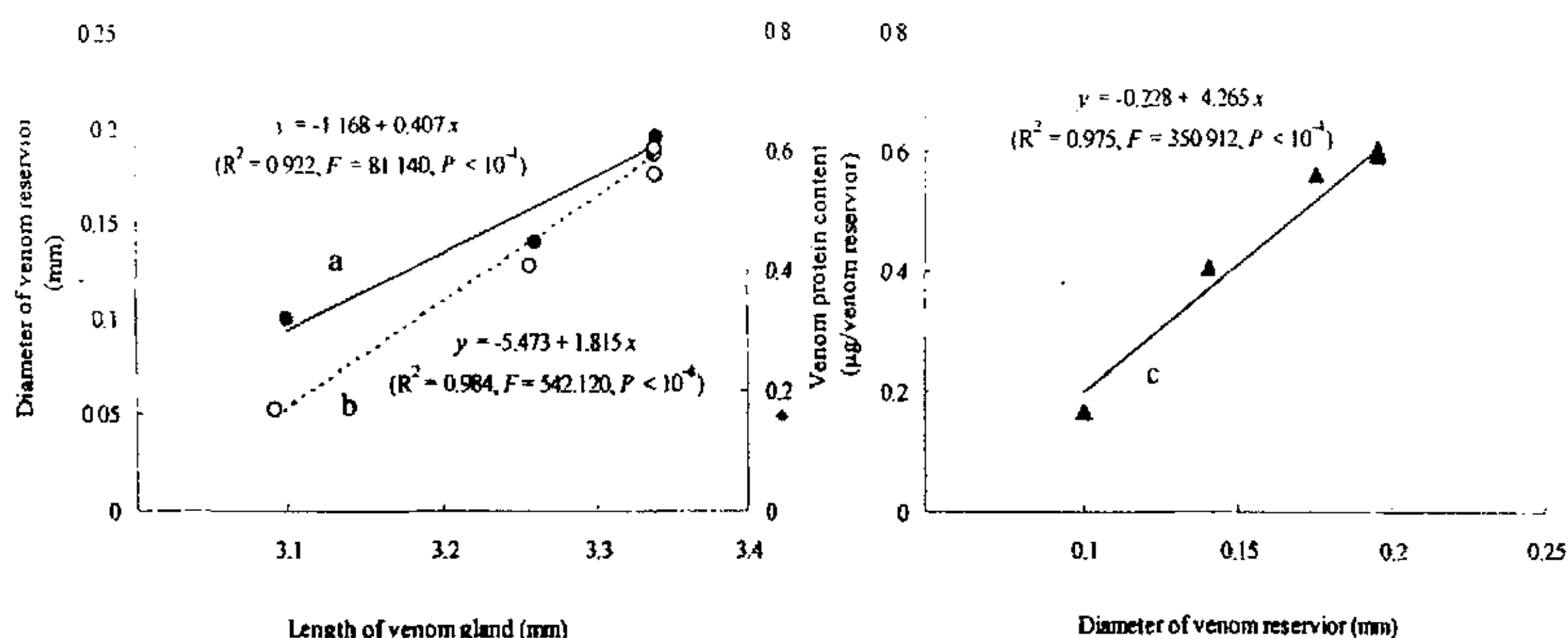


图 3-9 丽蝇蛹集金小蜂毒器官发育过程中的相互关系

Fig. 3-9 Relationships among different parts of venom apparatus in female *Nasonia vitripennis*

a: 毒囊直径与毒腺长度关系; b: 毒液蛋白含量与毒腺长度关系; c: 毒液蛋白含量与毒囊直径的关系。

a: Relationship between venom reservoir diameter and venom gland length; b: Relationship between venom protein content and venom gland length; c: Relationship between venom reservoir diameter and venom protein content.

喂食蜂蜜并正常交配的蝶蛹金小蜂毒腺长度、毒囊直径及毒液蛋白含量均与卵巢中成熟卵数量成相关关系，而与 I 和 II 级卵数量成负相关关系，说明蝶蛹金小蜂在正常营养条件下，其毒器官各部分发育与卵子发育相一致。丽蝇蛹集金小蜂毒器官各部分发育与其卵巢中 I 级卵、II 级卵及成熟卵数量无线性相关关系，说明二者发育不一致，这与两种寄生蜂的寄生类型有关，蝶蛹金小蜂系内寄生蜂，产卵于寄主血腔中，卵粒直接受到寄主昆虫免疫系统的作用，而毒液则可显著抑制这种作用 (Cai *et al.*, 2004)，故毒器官发育与卵子发育的一致性对提高寄生率是有益的，而丽蝇蛹集金小蜂系外寄生蜂，产卵于寄主蝇类围蛹的内表皮之上，寄主的免疫系统不能作用于其卵粒，故毒器官发育与卵子发育不一致也属正常，这也是寄生蜂在与寄主协同进化过程中形成的一种适应。

稻苞虫裹尸薄茧小蜂 *Euplectrus kuwanae* 羽化后 0 ~ 6 d 毒囊体积与卵巢中成熟卵数量成正相关，说明在此发育阶段毒囊的发育与卵子发育是一致的，但在发育后期（羽化后 8 ~ 10 d）不存在这种相关性 (Uematsu & Sakanoshita, 1987)，具体原因未知。

第四章 两种金小蜂毒液的蛋白组成及分子特性

寄生蜂毒液的性质与功能已有不少研究(Jones & Leluk, 1990; Jones *et al.*, 1994; Krishnan *et al.*, 1994; Coudron & Brandt, 1996; Parkinson & Weaver, 1999; Parkinson *et al.*, 2002; Dani *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004 a, b), 其中对活性组分的性质与功能的研究也较详(见第一章表 1-1), 且对部分活性蛋白已经进行了质谱鉴定(Parkinson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004 b)。其中的研究多集中于茧蜂科和姬蜂科, 而对金小蜂科毒液蛋白的组成及分子特性的研究尚未有报道, 故我们开展此方面研究。本章通过运用各种电泳技术, 分析两种金小蜂毒液的蛋白组成, 并对蝶蛹金小蜂毒液通过双向电泳分离所得表达量较高的点进行了质谱鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂、菜粉蝶、柑桔凤蝶的来源及毒液提取见第二章和第三章。Tn 和 Ha 细胞系均系浙江大学应用昆虫学研究所张传溪教授惠赠。

1.2 两种金小蜂毒液的蛋白质组成

1.2.1 梯度 PAGE

毒液提取液加等体积非变性样品缓冲液, 混匀, 10000 g 离心 10 min 上样。电泳采用 Tris-甘氨酸电极缓冲液系统, 以垂直平板电泳槽进行电泳。分离胶、浓缩胶浓度分别为 5 ~ 15% 和 4%, 上样量为 10 μ l (约 20 个毒囊), 浓缩胶和分离胶分别以 5 mA 和 15 mA 稳流电泳。电泳槽和电泳仪分别为 Bio-Rad 公司的 PROTEAN 3 cell 和 Model 3000 Xi。凝胶用考马斯亮蓝 R250 染液染色约 0.5 h。尔后, 脱色, Bio-Rad 公司的 GS-800 光密度扫描仪获取图像, Quantity-oneTM 分析图谱。

1.2.2 SDS-PAGE

毒液提取液加等体积 SDS 电泳样品缓冲液, 混匀, 煮沸 5 min 并离心后, 上样。电泳采用 Tris-甘氨酸-SDS 电极缓冲液系统, 分离胶、浓缩胶浓度分别为 10%和 4%, 上样量为 10 μ l (约 20 个毒囊), 电泳、染色、图像获取及分析方法同上。参见 Bio-Rad 公司的双向电泳操作指南。尔后, 脱色, 以 Bio-Rad 公司的 GS-800TM 光密度扫描仪获取图像, 以

Quantity-oneTM 软件分析图谱。

1.2.3 2-DE

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白双向电泳采用 Bio-Rad 公司的双向电泳操作系统，试剂配制及操作步骤如下：

第一向等电聚焦（7cm 的胶条，pH 3 ~ 10）：从冰箱中取-20℃冷冻保存的水化上样缓冲液，置室温溶解。在小管中加入 0.01 g DTT， Bio-Lyte 4 ~ 6、5 ~ 7 各 2.5 μ l，充分混匀。取 200 μ g 样品加入水化上样缓冲液至体积为 125 μ l，充分混匀。从冰箱取-20℃冷冻保存的 IPG 预制胶条（7cm, pH 3 ~10），于室温放置 10 min。沿着聚焦盘或水化盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。当所有的蛋白质样品都已经加入到聚焦盘或水化盘中后，用镊子轻轻的去掉预制 IPG 胶条上的保护层。轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上，使得胶条的正极（标有+）对应于聚焦盘的正极。在每根胶条上覆盖 2 ~ 3 ml 矿物油，防止胶条水化过程中液体的蒸发。对好正、负极，盖上盖子。设置等电聚焦程序。

表 4-1 等电聚焦程序

Table 4-1 the process of Isoelectric focusing

Step	Voltage	Voltage increasing form	Time	purpose
水化	50 V	--	12-16 h (17℃)	主动水化
S1	250 V	线性	30 min	除盐
S2	500 V	快速	30 min	除盐
S3	4000 V	线性	3 h	升压
S4	4000 V	快速	20000 Vh	聚焦
S5	500 V	快速	任意时间	保持

第二向 SDS-PAGE 电泳： 配制 10 %的丙烯酰胺凝胶一块。配制胶条平衡缓冲液 I、II。在桌上先放置干的厚滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上。将另一份厚滤纸用 MilliQ 水浸湿，挤去多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品。将胶条转移至溶胀盘中，每个槽一根胶条，在有胶条的槽中加入 5 ml 胶条平衡缓冲液 I。将样品水化盘放在水平摇床上缓慢摇晃 15 min。第一次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液 I（6 M 尿素、2% SDS、0.375 M pH 8.8 Tris-HCl、20%甘油和 0.2 g DTT）。并用滤纸吸取多余的平衡液。再加入胶条平衡缓冲液 II（6 M 尿素、2% SDS、0.375 M pH 8.8 Tris-HCl 、20%甘油和 0.25 g 碘乙酰胺），继续在水平摇床上缓慢摇晃 15 min。用滤纸吸去 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶上方玻璃板间多余的液体。将处理好的第二向凝胶放在桌面上，

长玻璃板在下, 短玻璃板朝上, 凝胶的顶部对着自己。将琼脂糖封胶液进行加热溶解。将 $10\times$ 电泳缓冲液稀释成 $1\times$ 电泳缓冲液。赶走缓冲液表面的气泡。第二次平衡结束后, 彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液 II。并用滤纸吸取多余的平衡液。将 IPG 胶条从样品水化盘中移出, 用镊子夹住胶条的一端使胶面完全浸没在 $1\times$ 电泳缓冲液中。然后将胶条胶面朝上放在凝胶的长玻璃板上。将放有胶条的 SDS-PAGE 凝胶转移到灌胶架上, 短玻璃板一面对着自己。在凝胶的上方加入低熔点琼脂糖封胶液。用镊子轻轻地将胶条向下推, 使之与聚丙烯酰胺凝胶胶面完全接触。放置 5 min, 使低熔点琼脂糖封胶液彻底凝固。在低熔点琼脂糖封胶液完全凝固后。将凝胶转移至电泳槽中。在电泳槽加入电泳缓冲液后, 接通电源, 10 mA 恒流电泳, 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。电泳结束后, 轻轻撬开两层玻璃, 取出凝胶, 并切角以作记号。然后用考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色液 (甲醇:冰醋酸:水=1:1:8) 脱色。尔后, 以 GS-800TM 光密度扫描仪 (Bio-Rad) 进行电泳图像扫描。电泳图像用 PDQuestTM 2-D 图像分析软件 (Bio-Rad) 进行分析。

1.3 蝶蛹金小蜂毒液蛋白的双向电泳图谱中部分蛋白点的质谱鉴定

对双向电泳胶上的表达量较高的点切下后, 分别记作 1、2、3、4、5、6、7, 蛋白点在胶上的相对位置见图 4-2。切下的点转到 1.5 ml Eppendorf 管中, 送至上海基康公司进行 MALDI-TOF MS 分析。并用 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/>) 数据库对 MS/MS 数据进行解析, 样品的检索的参数设置如下: Digest Used: Trypsin; Max. # Missed Cleavages: 1; Peptide N terminus: Hydrogen; Peptide C terminus: Free Acid; Cysteine Modification: carbamidomethylation; Instrument Name: MALDI-TOF; Sample ID (comment): Magic Bullet digests; Minimum Matches: 4; Sort Type: Score Sort; Considered modifications: | Peptide N-terminal Gln to pyroGlu | Oxidation of M | Protein N-terminus Acetylated |; Min Parent Ion Matches: 1; MOWSE On: 1; MOWSE P Factor: 0.4

1.4 蝶蛹金小蜂毒液活性组分的初步确定

毒液粗提液以 Millipore 公司的 Microcon[®] 离心超滤管分离, 毒液蛋白初步分为大于 100 kDa, 小于 100 kDa, 大于 50 kDa, 小于 50 kDa 4 个组分, 并调节浓度至 2 VRE/ μ l, 立即用于试验或 -70°C 保存。

毒液分离后组分对寄主血细胞的生测方法参见第二章。对昆虫细胞系的活性生测方法如下: 96 孔细胞培养板中加入 98 μ l Tn 细胞系或 Ha 细胞系及培养液 (细胞浓度约为 $10^5/\text{ml}$),

待细胞铺满整个孔底,加入 2 μl 毒液粗分后组分,使毒液各组分浓度为 0.02 VRE/ μl ,并各设 3 次重复,尔后置于 27 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养,分别于 0.5 和 4 h 后置 Leica 倒置显微镜下任选 3 个视野观察、考查各处理孔穴中延展和未延展的 Tn 细胞。同时,以 Eppendorf 微量移液器吸出各处理孔穴中的血细胞悬浮液,加等体积的 0.04% 台盼蓝溶液混匀,室温放置 10 min 后,以血球计数板于 Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色(死亡)和未被染色(存活)的 Tn 细胞和 Ha 细胞的数量,计算细胞死亡率。以加 TBS 的孔为阴性对照,以加 2 VRE 毒液粗提液的孔为阳性对照,每处理重复 3 孔。

2 结果

2.1 两种金小蜂毒液蛋白的组成及蝶蛹金小蜂毒液部分蛋白的质谱鉴定

梯度PAGE后,以Quantity OneTM软件(Bio-Rad, USA)分析表明,蝶蛹金小蜂毒液蛋白在自然状态下由12条带组成,分子量范围为17.47~879.67 kDa,其中7条带大于100 kDa,蛋白含量以分子量为558.64 kDa, 308 kDa和178.17 kDa的三个蛋白为主。丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的梯度PAGE图谱由9条带组成,分子量范围为17.62~809.94 kDa,其中以分子量为246.20 kDa蛋白含量为最高(图4-1A)。SDS-PAGE后,以Quantity OneTM软件(Bio-Rad, USA)分析表明,蝶蛹金小蜂毒液蛋白主要由17条带组成,分子量范围为14.11~165.18 kDa,其中9条带分子量集中于21.17~44.41 kDa,而丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白由14条带组成,分子量范围为14.11~155.93 kDa,其中6条带集中于21.15~36.68 kDa(图4-1B)。

双向电泳后,以PDQuestTM(Bio-Rad, USA)分析表明,蝶蛹金小蜂毒液蛋白由143个点组成,等电点主要集中于4~7之间(图4-2,表4-2),而丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白等电点多大于5(图4-3)。对蝶蛹金小蜂毒液双向电泳胶上高丰度的7个点进行质谱鉴定(图4-4),并对质谱数据进行查询表明,其中7个点与数据库中所有已知蛋白的匹配率均不高(表4-3~4-9)。但通过分析数据库中已知蛋白和进行测定的毒液蛋白的分子量和等电点表明,点1和2可能为20-蜕皮酮水解酶(ecdysone 20 hydroxylase);3和4可能为(transcription factor hunchback);5可能为精氨酸激酶(arginine kinase);6可能为肌钙蛋白T(troponin T);7可能为原肌球蛋白(tropomyosin),具体结论还有待验证。

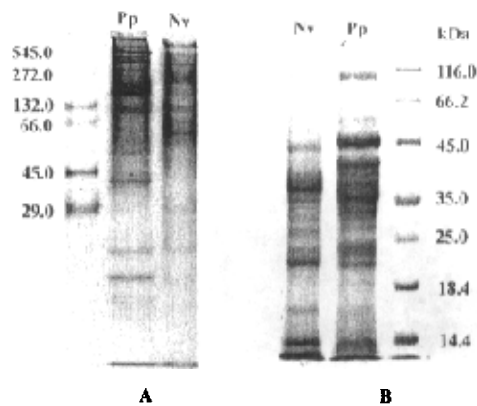


图 4-1 两种金小蜂毒液蛋白的梯度 PAGE (A) 和 SDS-PAGE (B) 图谱

Fig. 4-1 Gradient PAGE (A) and SDS-PAGE (B) profiles of venom proteins from two pteromalid wasps

Pp: 蝶蛹金小蜂毒液; Nv: 丽蝇蛹集金小蜂毒液。

Pp: *Pteromalus puparum* venom; Nv: *Nasonia vitripennis* venom.

2.2 蝶蛹金小蜂毒液活性组分的初步确定

蝶蛹金小蜂毒液抑制两种寄主血细胞及 Tn 细胞系延展并引起细胞死亡的活性组分为分子量大于 100 kDa 的蛋白，引起 Ha 细胞系死亡率的活性组分也为大于 100 kDa 蛋白（表 4-10），

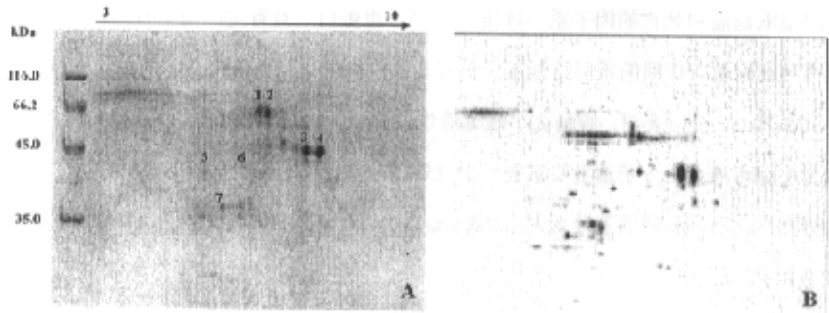


图 4-2 蝶蛹金小蜂毒液蛋白的双向电泳图谱

Fig. 4-2 Two-directional electrophoresis profile of venom proteins of *Pteromalus puparum*

A: 原始图; B: 软件分析处理后图

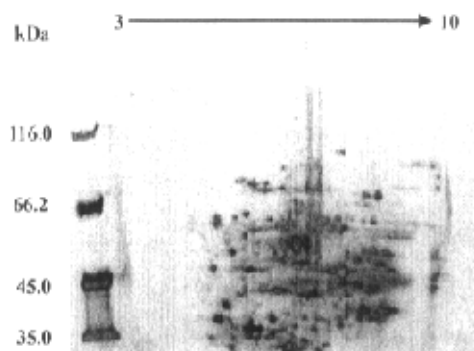


图 4-3 丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的双向电泳图谱

Fig. 4-3 Two-directional electrophoresis profile of venom proteins of *Nasonia vitripennis*

3 讨论

蝶蛹金小蜂毒液蛋白有 7 条带的自然分子量大于 100 kDa, 且表达量最高的 3 个蛋白分子量均大于 100 kD (图 4-1A)。丽蝇蛹集金小蜂蛋白自然状态下由 9 条带组成, 表达量最高的蛋白为 246.20 kDa (图 4-1B)。蝶蛹金小蜂毒液中有活性组分是大于 100 kDa 的蛋白组分, 属大分子蛋白, 这与膜翅目社会性昆虫毒液中活性组分多为低分子蛋白或小肽有所不同。瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液对昆虫细胞系 SF21 有毒性的组分为小于 13 kDa 蛋白, 抑制寄主血细胞聚集和包裹作用的活性因子为 28 和 32 kDa 蛋白, 而通过初步分离确定蝶蛹金小蜂毒液对两种昆虫细胞系有毒性的组分和抑制寄主血细胞延展并诱导血细胞死亡的因子均为大于 100 kDa 的蛋白, 说明不同寄生蜂毒液中毒性因子因种而异。其中蝶蛹金小蜂毒液中引起细胞延展和死亡的因子系一种蛋白或是一组蛋白? 对寄主血细胞有活性的蛋白组分与对两种细胞系有作用的蛋白组分是否相同? 都值得做进一步研究。

SDS-PAGE 分析表明, 蝶蛹金小蜂毒液蛋白分子量主要集中于 21.17 ~ 44.41 kDa, 丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白分子量主要集中于 21.15 ~ 36.68 kDa。且通过与已经研究的寄生蜂毒液的组分相比, 不同种间的差异太大 (Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; Coudron *et al.*, 2000), 很难做有意义的比较。

对蝶蛹金小蜂毒液双向电泳图谱中 7 个表达量较高的蛋白点进行蛋白质谱分析表明, 7 个点与 UCSF 数据库中所有点的质谱资料相似度均不高, 最高仅为 35%, 说明此类数据较缺乏, 且所查数据也仅集中于东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*、美洲大蠊 *Periplaneta americana*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等几种昆虫, 说明昆虫蛋白组学研究的相对滞后。

表 4-2 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳图谱中各蛋白点的性质

Table 4-2 Protein spots in the profile of 2-D electrophoresis of *Pteromalus puparum* venom

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
6001	18.47	7.13	2302	48.33	5.84
1001	18.6	5.56	3301	48.39	5.97
2001	19.55	5.84	2303	48.71	5.9
9004	21.65	8.56	7302	48.87	7.65
4004	23.3	6.34	7303	49.07	7.85
7003	23.77	7.92	7301	49.3	7.59
3001	24.17	6	6302	49.76	7.05
4002	24.86	6.18	4304	49.79	6.36
9005	24.88	8.35	4303	49.83	6.18
7002	25	7.63	6301	50.23	6.89
7001	25.21	7.46	6403	52.38	7.34
6002	25.84	7.22	6402	52.97	7.25
4001	26.16	6.17	4404	53.93	6.37
2002	26.35	5.84	4401	54	6.17
5001	26.35	6.72	3401	54.07	6.07
7004	27.01	7.93	6401	56.22	7.25
4005	27.09	6.34	2401	57.4	5.84
4003	27.44	6.3	4402	57.46	6.17
2101	28.47	5.64	9402	60.44	9.58
2104	28.51	5.81	4403	60.86	6.17
2105	28.55	5.92	3402	60.96	6.07
1101	28.62	5.04	2402	61	5.84
3105	28.64	6.14	7401	63.13	7.63
9104	28.66	8.16	6501	64.46	6.9
1103	28.67	5.42	4502	64.46	6.33
9102	29.05	8.86	4501	64.51	6.18
5103	29.15	6.51	5502	64.56	6.66
4103	30.07	6.32	4503	64.68	6.42
5101	30.26	6.65	3502	64.83	6.07
7102	30.71	7.9	3501	64.84	5.94
3103	30.76	6.13	2502	64.85	5.84
2103	30.97	5.8	2501	65.01	5.66
2102	31.06	5.65	5501	65.04	6.51
5104	31.32	6.53	6505	67.67	7.37
4101	31.73	6.16	6504	67.92	7.25
9103	32.59	8.44	7502	68.22	7.59
4102	32.88	6.31	6503	68.37	7.16
7101	32.96	7.94	7501	68.38	7.49
3102	33.15	6.13	7503	68.43	7.72
5102	33.38	6.68	7504	68.51	7.91

续表 4-2

SSP	Mr	pI	SSP	Mr	pI
3101	33.96	5.95	6502	68.58	7.04
3104	34.01	6.14	9601	69.02	8.11
1102	36.24	5.34	6601	69.27	6.89
9101	36.53	9.98	4601	69.27	6.18
4104	37.05	6.4	4602	69.43	6.34
5202	38.01	6.61	3602	69.48	6.08
4203	38.22	6.28	5603	69.61	6.75
7202	38.27	7.86	2602	69.62	5.84
4201	38.36	6.16	3601	69.64	5.96
1204	38.44	5.6	5601	69.65	6.54
1202	38.49	5.43	5602	69.73	6.64
9202	39.84	8.53	2601	69.78	5.66
9201	39.94	8.12	6602	75.13	6.9
2201	40.17	5.65	7601	81.35	7.98
2203	40.27	5.92	9901	84.9	8.12
1203	40.35	5.49	903	85	4
1201	40.43	4.92	6905	85.01	7.16
7204	40.7	7.54	2902	85.84	5.85
2202	41.91	5.75	1902	85.92	4.92
4202	42.2	6.17	2903	85.98	5.92
7201	43.38	7.57	2901	86.03	5.66
5201	43.69	6.54	5901	86.06	6.66
5203	44.1	6.68	4901	86.06	6.18
6201	44.24	7.23	4903	86.1	6.43
7203	44.39	7.89	3901	86.23	6.08
4301	44.54	6.16	1903	86.36	5.23
3302	44.68	6.07	1901	86.53	4.63
9303	45	9.88	9904	87	10
1301	45.25	5.33	4902	89.13	6.32
4302	47.15	6.17	6903	89.28	7.05
9301	48.2	8.09	7901	94.2	7.74
2301	48.28	5.66			

表 4-3 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 1)

Table 4-3 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from <i>Pteromalus puparum</i> venom (spot 1)						
Rank	MOWSE Score	Masses Matched(%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name
1	17	2/15 (13%)	11811.6 / 9.49		118019	Cytochrome C
2	6.61	2/15 (13%)	16136.6 / 8.42	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	21217996	pacifastin-related peptide precursor
2	6.61	2/15 (13%)	16140.6 / 8.42		21217994	pacifastin-related peptide precursor
3	5.02	2/15 (13%)	60254.7 / 6.39	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	5106554	ecdysone 20 hydroxylase
4	3.17	2/15 (13%)	30224.0 / 8.39	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	1617444	schistostatin precursor
4	2.54	2/15 (13%)	62442.9 / 9.22	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	2764507	nicotinic acetylcholine receptor, alpha 1 subunit
5	2.33	2/15 (13%)	75512.2 / 6.61	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	1531589	allergen
5	2.15	2/15 (13%)	78435.7 / 6.18	蝗虫 <i>Schistocerca americana</i>	3142374	embryonic hemolymph protein precursor
5	1.94	2/15 (13%)	62369.7 / 6.16	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	6448469	homologue of Sarcophaga 26, 29kDa proteinase
5	1.67	2/15 (13%)	76320.0 / 6.47	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	1710156	juvenile hormone binding protein
5	1.94	2/15 (13%)	62369.7 / 6.16	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	6448469	homologue of Sarcophaga 26, 29kDa proteinase
5	1.67	2/15 (13%)	76320.0 / 6.47	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	1710156	juvenile hormone binding protein

表 4-4 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 2)

Table 4-4 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pieromatus puparum* venom (spot 2)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	17	2/15 (13%)	11811.6 / 9.49	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	118019	Cytochrome C	21
2	5.02	2/15 (13%)	60254.7 / 6.39	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	5106554	ecdysone 20 hydroxylase	21
3	3.17	2/15 (13%)	30224.0 / 8.39	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	1617444	schistostatin precursor	8
3	2.6	2/15 (13%)	51010.6 / 9.06	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	8648961	eukaryotic translation initiation factor 2 gamma	8
3	2.54	2/15 (13%)	62442.9 / 9.22	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	2764507	nicotinic acetylcholine receptor, alpha1 subunit	21
4	2.33	2/15 (13%)	75512.2 / 6.61	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	1531589	allergen	9
4	1.87	2/15 (13%)	26752.1 / 5.76		5381155	Regenectin	10
4	1.67	2/15 (13%)	76320.0 / 6.47	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	1710156	juvenile hormone binding protein	13
5	1.36	2/15 (13%)	71142.4 / 5.24	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	2494392	Acetylcholinesterase precursor (AChE)	7
5	1.1	2/15 (13%)	45543.4 / 8.69	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	416656	arrestin homolog	15

表 4-5 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 3)
Table 4-5 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pteromalus puparum* venom (spot 3)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	3.85	3/15 (20%)	78673.6 / 7.25	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	8134686	semaphorin 2a precursor	25
2	3.15	3/15 (20%)	53734.9 / 7.66		15212253	transcription factor hunchback	28
2	3.03	2/15 (13%)	55963.2 / 8.68	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	15990575	hunchback transcription factor	9
2	2.6	3/15 (20%)	51010.6 / 9.06	马龄薹甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	8648961	eukaryotic translation initiation factor 2 gamma	15
3	2.01	2/15 (13%)	28316.0 / 5.05	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	5381157	Cockroach lectin-like protein CL3	7
3	2	2/15 (13%)	28393.2 / 5.21		5381159	Cockroach lectin-like protein CL2	4
3	2	2/15 (13%)	25026.3 / 5.72	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	1902917	lectin-related protein	7
3	1.67	2/15 (13%)	75512.2 / 6.61		1531589	allergen	7
4	1.47	2/15 (13%)	34046.2 / 8.46	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	28628004	USP-RXR	11
4	1.38	2/15 (13%)	36344.7 / 6.78		28394605	pumilio RBD	5

表 4-6 蠼螋金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 4)
Table 4-6 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pieromatus puparum* venom (spot 4)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched(%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	3.15	2/13 (15%)	53734.9 / 7.66	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	15212253	transcription factor hunchback	16
1	2.51	2/13 (15%)	19931.8 / 9.05		5007058	wg	6
2	2	2/13 (15%)	25026.3 / 5.72	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	1902917	lectin-related protein	11
2	1.53	2/13 (15%)	78673.6 / 7.25		8134686	semaphorin 2a precursor	16
3	1.19	2/13 (15%)	41879.5 / 8.49	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	10720059	innexin-1	12
3	0.98	2/13 (15%)	51010.6 / 9.06	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	8648961	eukaryotic translation initiation factor 2 gamma	5
3	0.865	2/13 (15%)	36445.7 / 7.51	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	5835251	ND1	6
3	0.841	2/13 (15%)	37518.1 / 9.30	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	15146041	pairberry 2 transcription factor	32
3	0.802	2/13 (15%)	62369.7 / 6.16	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	6448469	homologue of Sarcophaga 26, 29kDa proteinase	7
3	0.766	2/13 (15%)	65297.9 / 7.23	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	34305305	5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	16

表 4-7 蠅蛹金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 5)
Table 4-7 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pteromalus puparum* venom (spot 5)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	117	4/15 (26%)	40016.6 / 5.87	沙漠蝇 <i>Schistocerca gregaria</i>	3183060	arginine kinase	24
2	9.98	3/15 (20%)	60254.7 / 6.39	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	5106554	ecdysone 20 hydroxylase	14
3	5.38	2/15 (13%)	42530.9 / 8.00	沙漠蝇 <i>Schistocerca gregaria</i>	2499365	locust opsin 2	6
3	5.3	2/15 (13%)	50240.2 / 8.85		18874391	translation elongation factor-1 gamma	7
4	2.85	2/15 (13%)	59185.3 / 5.17	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	2764509	nicotinic acetylcholine receptor, alpha2 subunit	24
4	2.62	2/15 (13%)	50383.3 / 9.34		18874389	elongation factor-1 alpha	7
5	2.08	2/15 (13%)	24004.1 / 7.63	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	31745714	ferritin	7
5	1.9	4/15 (26%)	45543.4 / 8.69	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	416656	arrestin homolog	35
5	1.65	3/15 (20%)	75282.7 / 6.96	沙漠蝇 <i>Schistocerca gregaria</i>	119882	Fasciclin I precursor (FAS I)	31
5	1.55	3/15 (20%)	60745 / 5.7	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	11993663	Inducible heat shock 70 kDa protein	6

表 4-8 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 6)
Table 4-8 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pteromalus puparum* venom (spot 6)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	103	3/15 (20%)	11208.0 / 5.59	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	14140213	neuroparsin 1 precursor	19
2	42	2/15 (13%)	11315.2 / 7.46		6093528	preneuroparsin A	13
3	8.98	3/15 (20%)	50240.2 / 8.85	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	18874391	translation elongation factor-1 gamma	14
4	5.64	2/15 (13%)	71482.2 / 5.39		37993866	heat shock protein 70	15
5	3.92	2/15 (13%)	19404.5 / 9.08	马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	3228682	GABA receptor subunit	17
6	3	2/15 (13%)	64426.5 / 6.06	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	27463689	helicase RM62-like protein E	19
6	2.64	2/15 (13%)	50383.3 / 9.34		18874389	elongation factor-1 alpha	19
7	1.83	2/15 (13%)	45543.4 / 8.69	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	416656	arrestin homolog	14
8	1.09	2/15 (13%)	76320.0 / 6.47		1710156	juvenile hormone binding protein	23
8	1.07	2/15 (13%)	45908.2 / 4.98	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	4928474	troponin T	16

表 4-9 蠼螋金小蜂毒液双向电泳部分蛋白点的质谱鉴定 (Spot 7)
Table 4-9 MALDI-TOF MS identification of 2-DE Spots from *Pteromalus puparum* venom (spot 7)

Rank	MOWSE Score	Masses Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Accession	Protein Name	Intensity matched %
1	5.56	2/15 (13%)	50240.2 / 8.85	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	18874391	translation elongation factor-1 gamma	7
2	3.95	2/15 (13%)	12306.2 / 9.19	沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	27463681	helicase RM62-like protein A	11
3	3.04	2/15 (13%)	49655.4 / 7.22		2352418	extra sex combs	5
4	2.17	2/15 (13%)	32439.5 / 4.70	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	401204	Tropomyosin	26
4	1.96	2/15 (13%)	42375.1 / 6.55	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	2133566	Pea-allatostatin precursor	26
4	1.89	2/15 (13%)	32795.0 / 4.72		4378573	tropomyosin	25
5	1.08	4/15 (26%)	45543.4 / 8.69	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	416656	arrestin homolog	14
5	1.05	2/15 (13%)	45908.2 / 4.98	美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	4928474	troponin T	17
5	0.893	2/15 (13%)	55963.2 / 8.68	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	15990575	hunchback transcription factor	11

表 4-10 蝶蛹金小蜂毒液不同分子量范围蛋白的活性分析

Table 4-10 Physiological activity of *Pteromalus puarum* venom with different molecular mass ranges

Cells	Time	Molecular weight				TBS	Venom
		> 50 kDa	< 50 kDa	> 100 kDa	< 100 kDa		
Pr (S)	0.5 h	17.22 ± 3.77 b	81.27 ± 0.39 a	18.70 ± 3.75 b	81.28 ± 1.41 a	81.28 ± 1.41 a	15.00 ± 3.56 b
	4 h	11.82 ± 1.24 b	81.74 ± 1.41 a	12.04 ± 0.62 b	83.18 ± 1.03 a	83.18 ± 1.03 a	11.00 ± 2.72 b
Pr (M)	0.5 h	27.48 ± 2.97 a	5.34 ± 4.64 b	28.96 ± 4.18 a	2.38 ± 4.12 b	3.70 ± 6.42 b	28.80 ± 5.23 a
	4 h	35.84 ± 2.57 a	7.20 ± 6.46 b	36.71 ± 1.61 a	5.34 ± 4.64 b	5.55 ± 5.09 b	37.88 ± 6.32 a
Px (S)	0.5 h	14.67 ± 0.56 b	82.84 ± 1.10 a	16.06 ± 0.34 b	81.67 ± 1.24 a	83.55 ± 1.07 a	14.12 ± 1.11 b
	4 h	9.81 ± 0.21 b	83.01 ± 1.22 a	10.31 ± 1.72 b	83.20 ± 1.33 a	84.42 ± 2.54 a	9.99 ± 2.90 b
Px (M)	0.5 h	37.26 ± 3.49 a	2.56 ± 4.44 b	36.49 ± 1.72 a	2.38 ± 4.12 b	2.22 ± 3.85 b	37.22 ± 1.39 a
	4 h	41.50 ± 0.28 a	5.16 ± 4.51 b	40.87 ± 5.04 a	4.95 ± 4.29 b	5.34 ± 4.64 b	41.69 ± 3.91 a
Tn (S)	0.5 h	12.46 ± 0.83 b	88.21 ± 0.80 a	11.89 ± 1.71 b	88.38 ± 0.53 a	87.04 ± 1.57 a	11.34 ± 1.66 b
	4 h	10.52 ± 0.52 b	90.17 ± 1.88 a	9.85 ± 1.69 b	89.59 ± 0.66 a	90.75 ± 2.48 a	9.49 ± 0.44 b
Tn (M)	0.5 h	83.76 ± 0.74 a	15.46 ± 2.16 b	84.87 ± 1.68 a	12.85 ± 1.30 b	9.11 ± 2.95 b	81.09 ± 2.18 a
	4 h	86.49 ± 3.60 a	17.68 ± 2.31 b	86.07 ± 2.50 a	18.94 ± 3.16 b	14.17 ± 2.20 b	86.37 ± 2.03 a
Ha (M)	0.5 h	73.25 ± 1.79 a	2.77 ± 4.81 b	73.69 ± 1.18 a	3.03 ± 5.25 b	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
	4 h	94.19 ± 5.04 a	7.22 ± 6.74 b	94.41 ± 4.90 a	5.81 ± 5.04 b	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

注: Pr, Px, Tn 和 Ha 分别示菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞、粉纹夜蛾和棉铃虫细胞系; M: 死亡率; S: 蔓延率; 同一行中平均数后字母差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: Pr, Px, Tn and Ha mean hemocytes of *Pieris rapae* and *Papilio xuthus*, cell lines of *Trichoplusia ni* and *Helicoverpa armigera*, respectively; M: Mortality; S: Spreading percent; Means in the same row followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).

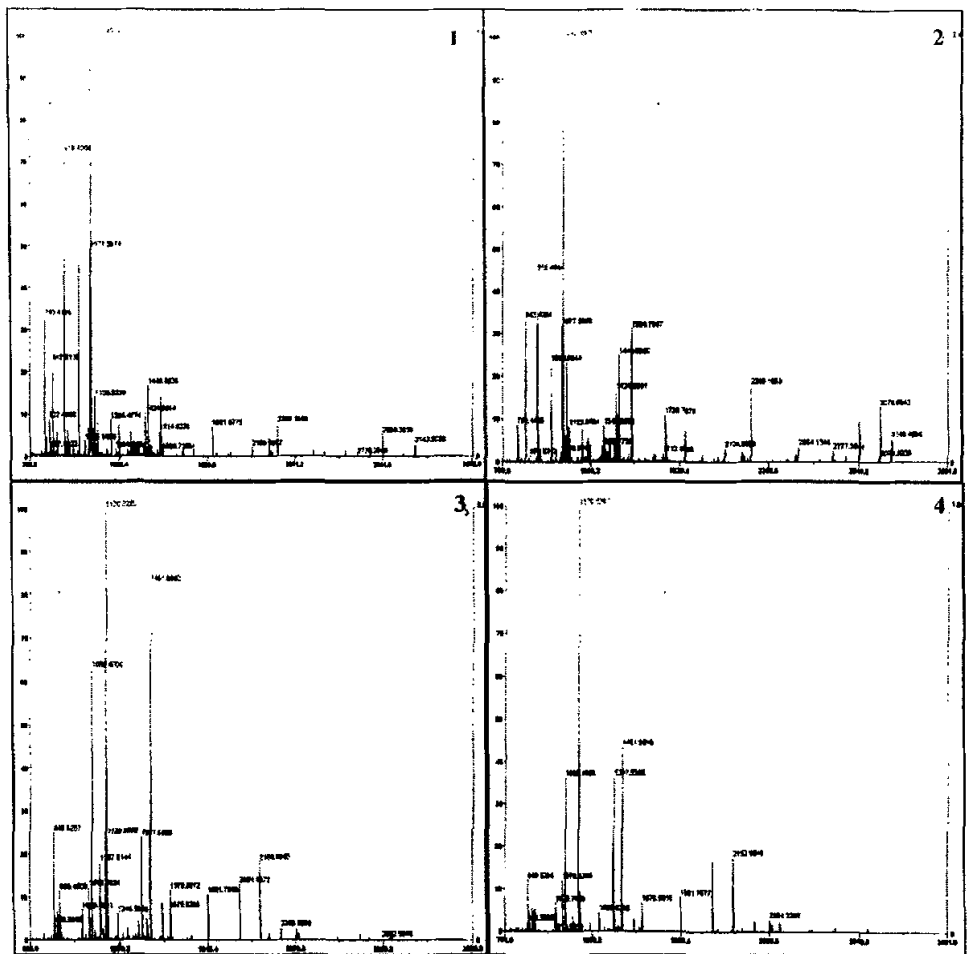


图 4-4 蝶蛹金小蜂毒液双向电泳图谱中 7 个蛋白点的质谱鉴定 (1~4)

Fig. 4-4 MALDI-TOF MS identification of seven 2-DE spots from *Pteromalus puparum* venom (1~4)

续图

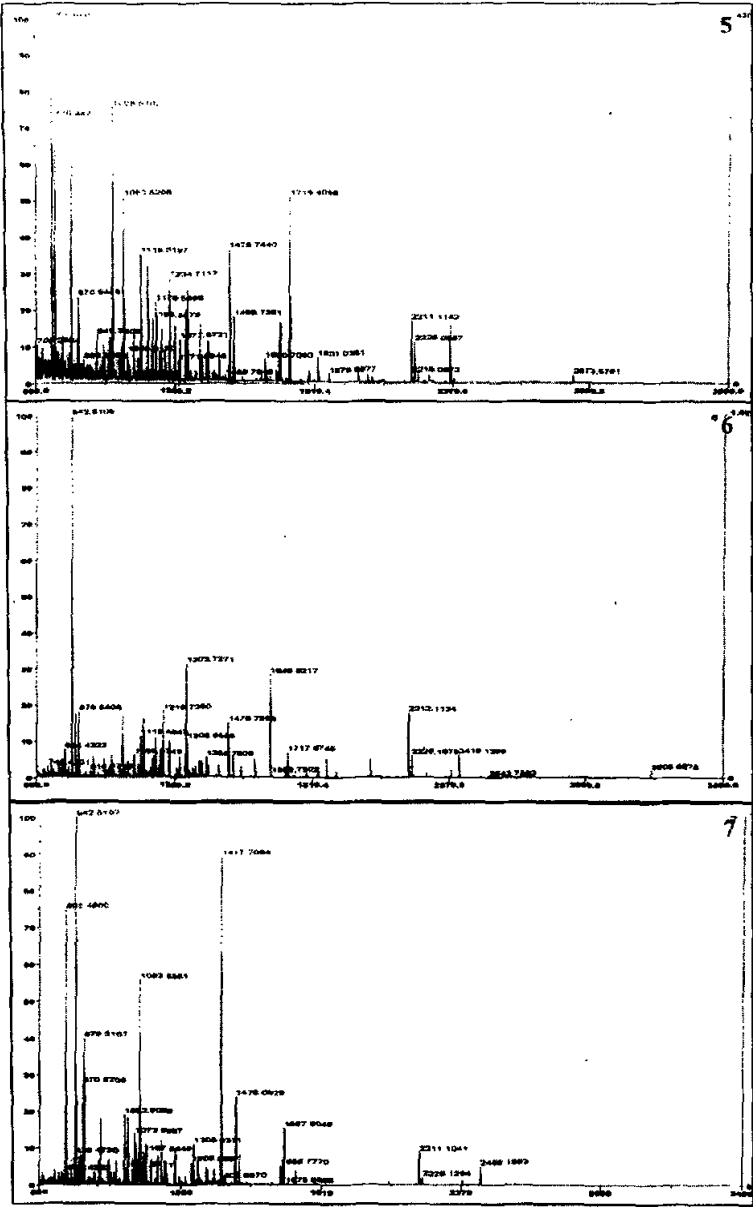


图 4-4 蜚蠊金小蜂毒液双向电泳图谱中 7 个蛋白点的质谱鉴定 (5 ~ 7)

Fig. 4-4 MALDI-TOF MS identification of seven 2-DE spots from *Pteromalus puparum* venom (5 ~ 7)

第五章 影响两种金小蜂毒液活性的理化因子

寄生蜂毒液有抑制寄主免疫反应 (Parkinson & Weaver, 1999; Rivers *et al.*, 2002; Asgari *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004)、调控寄主内分泌并干扰寄主正常生长发育 (Morale-Ramos *et al.*, 1995; Coudron & Brandt, 1996)、调控寄主营养状况 (Rivers *et al.*, 1993; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; 2004; Rivers, 2004) 及抑制寄主生殖系统发育 (Reed & Beckage, 1997; Digilio *et al.*, 2000) 的功能。这些功能的实现常会受到外界条件, 诸如温度、酸碱度、盐浓度、蛋白酶等的影响。然而, 此方面的研究较少 (Coudron & Brandt, 1996)。因此, 为明确各环境因子对蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液生理活性的影响, 本章中分别以不同温度、酸度、盐浓度、蛋白酶、表面活性剂及有机溶剂等处理两种金小蜂毒液, 考察其对外界环境的耐受能力, 为毒液活性因子的分离纯化与生测, 乃至以后在生物防治中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂、菜粉蝶、柑桔凤蝶的来源及毒液提取见第二章和第三章。Tn 和 Ha 细胞系来源见第四章。

1.2 毒液的处理

1.2.1 温度

取毒液粗提液, 以 TBS 稀释至毒液浓度为 2 VRE/ μ l, 并分别于 30, 40, 50, 60, 80, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min, 立即用于试验。以不含毒液的不同温度处理后的 TBS 为阴性对照, 以未处理毒液为阳性对照。

1.2.2 酸度

分别配制 pH 3, 5, 6.7, 7.5, 8, 10 的缓冲液, 用于寄生蜂毒液的提取, 并调节毒液浓度为 2 VRE/ μ l, 立即用于试验或-70 $^{\circ}$ C 保存。以不含毒液的不同 pH 值的缓冲液为阴性对照, 未处理毒液为阳性对照。

1.2.3 表面活性剂

在 1 ml 毒液粗提液中分别加入 100 mg SDS、Chaps, 100 μ l NP 40、Tween 20 和 Triton X-100, 并将处理后的毒液浓度调节至 2 VRE/ μ l, 立即用于试验或-70 $^{\circ}$ C 保存。以不含毒液的表面活性剂溶液为阴性对照, 未处理毒液为阳性对照。

1.2.4 蛋白酶

在毒液粗提液中加入蛋白酶 K 或胰蛋白酶使之终浓度为 1 mg/ml, 并于 37 $^{\circ}$ C 保育 10 min,

最后调节毒液浓度为 2 VRE/ μ l, 立即用于试验或-70℃保存。以不含毒液的 1 mg/ml 的蛋白酶 K 或胰蛋白酶对阴性对照, 以未处理毒液为阳性对照

1.2.5 盐浓度

稀释毒液浓度至 2 VRE/ μ l, 加 NaCl 使终浓度分别为 0.2, 0.4, 0.8 M 的 NaCl 溶液, 立即用于试验或-70℃保存。以不含毒液的不同浓度的 NaCl 溶液为阴性对照, 以未处理毒液对阳性对照。

1.2.6 有机溶剂

参照 Coudron & Brandt (1996) 的方法。寄生蜂毒液粗提液与等体积的氯仿: 乙醇 (2: 1, v: v) 或正己烷混合, 涡旋 2 次, 每次 1 min, 混匀, 12000 g 离心 5 min, 有机相真空干燥后, 溶于乙腈, 并悬浮于水-有机溶液中 (25 mM 磷酸钾缓冲液, PPB, pH7.0: 乙腈 = 7: 1, v: v), 水相真空干燥后以一定体积的 PPB 重悬后用于生测。以不含毒液的 PPB 为阴性对照, 未处理毒液为阳性对照。

1.2.7 菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物及中肠液

取菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物和中肠液, 按 1: 10 (v/v) 的比例加到蝶蛹金小蜂毒液粗提液中, 并以缓冲液调节其浓度为 2 VRE/ μ l, 37℃保育 10 min, 立即用于试验, 以加热煮沸 10 min 后的菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物和中肠液为阴性对照, 未处理毒液对阳性对照。

1.3 处理后毒液活性的测定

将上处理毒液分别以寄主昆虫血细胞及两种昆虫细胞系进行活性测定, 并分别以 TBS 作阴性对照, 以毒液粗提液作阳性对照。每处理重复 3 次。菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞提取和毒液活性离体生测参照第二章, 昆虫细胞系的离体培养和毒液活性生测方法参照第四章。

2 结果

2.1 温度

温度对蝶蛹金小蜂毒液生理活性有显著影响, 随处理温度的升高毒液的活性逐渐减弱, 当处理温度低于 50℃时, 蝶蛹金小蜂毒液活性基本不受影响; 当处理温度达 60℃, 毒液活性大部分丧失; 当处理温度大于 80℃时, 毒液活性完全丧失 (图 5-1)。处理温度在 30~100℃时, 随处理温度的升高, 毒液的活性逐渐减弱, 直至丧失, 处理温度与毒液引起 Ha 细胞的校正死亡率成负相关 (图 5-3), 处理后 0.5 h 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡的处理温度最高为 53.10 (22.17~249.04) 和 33.34 (15.40~130.69), 处理后 4 h 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡的处理温度最高为 59.44 (45.82~80.05) 和 48.61 (37.95~64.53)。

温度同样可显著影响丽蝇蛹集金小蜂毒液的生理活性, 当处理温度达 50℃时, 毒液生理功能受到部分影响, 处理温度大于 60℃时, 毒液生理功能基本丧失。当处理温度在 30~100℃时, 随处理温度的升高, 毒液的活性逐渐减弱, 直至丧失 (图 5-1), 且处理温度与毒液引起的 Ha 细胞校正死亡率成负相关 (图 5-3), 处理后 0.5 h, 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡的处理温度最高为 47.37 (25.04~122.05) 和 33.02 (18.51~77.93), 处理后 4 h, 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡的处理温度最高为 51.30 (45.92~57.69) 和 3.95 (39.51~49.20) (表 5-1)。

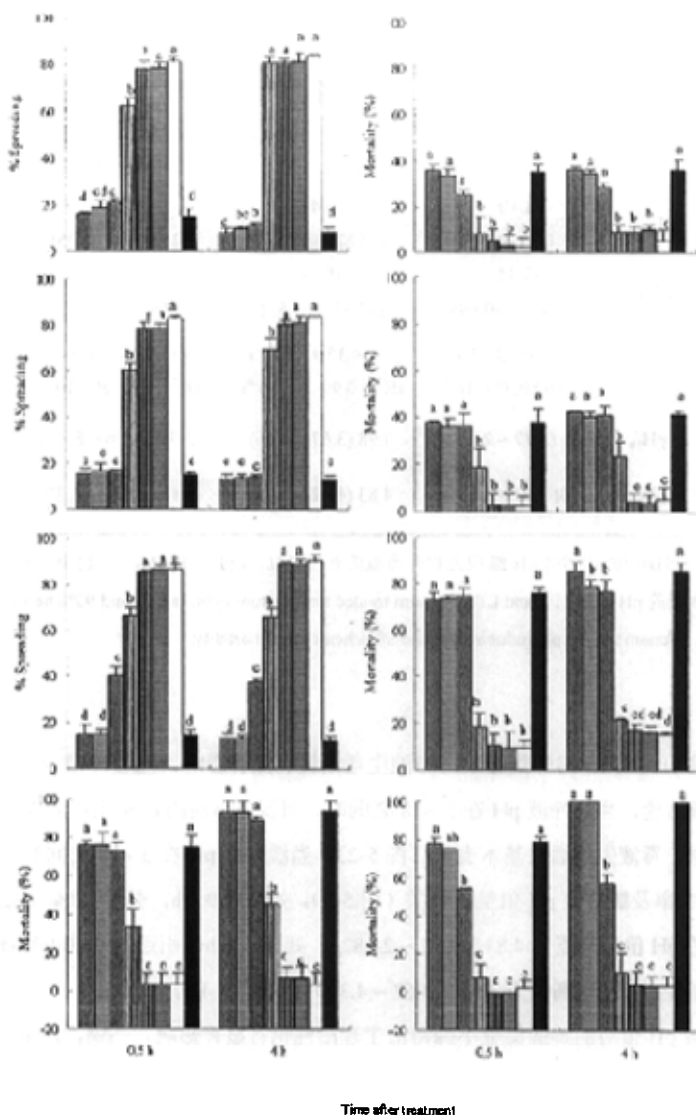


图 5-1 温度处理对两种金小蜂毒液生理功能的影响

Fig. 4-5 Effects of temperature on physiological functions of *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* venoms

A, B: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展 (A) 和存活 (B) 的影响; C, D: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹血细胞延展 (C) 和存活 (D) 的影响; E, F: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对 Tn 细胞系延展 (E) 和存活 (F) 的影响; G, H: 温度处理后蝶蛹金小蜂毒液 (G) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (H) 对 Ha 细胞存活的影响。A, B: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (A) and mortality (B) of *Pieris rapae* hemocytes; C, D: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (C) and mortality (D) of *Papilio xuthus* hemocytes; E, F: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (E) and mortality (F) of Tn cells; G, H: Effects of *Pteromalus puparum* venom (G) and *Nasonia vitripennis* venom (H) treated with different temperature on the mortality of Ha cells.

表 5-1 两种金小蜂毒液引起 Ha 细胞死亡 50%和 90%时的处理温度及 pH

Table 5-1 Treated temperature and pH of venoms from two species of pteromalid wasps resulted in 50% and 90% mortality of Ha cells

Treatment		Pp-venom		Nv-venom	
		0.5 h	4 h	0.5 h	4 h
Temperature	LT ₅₀	$y = 15.94 - 6.34x$ ($R^2 = 0.93, P < 10^{-4}$)	$y = 31.04 - 14.68x$ ($R^2 = 0.99, P < 10^{-4}$)	$y = 18.70 - 8.18x$ ($R^2 = 0.95, P < 10^{-4}$)	$y = 37.64 - 19.09x$ ($R^2 = 0.99, P < 10^{-4}$)
		53.10 (22.17 ~ 249.04)	59.44 (45.82 ~ 80.05)	47.37 (25.04 ~ 122.05)	51.30 (45.92 ~ 57.69)
	LT ₉₀	33.34 (15.40 ~ 130.69)	48.61 (37.95 ~ 64.53)	33.02 (18.51 ~ 77.93)	43.95 (39.51 ~ 49.20)
		$y = 1.91 - 4.53x$ ($R^2 = 0.89, P < 10^{-4}$)	$y = -4.15 + 15.26x$ ($R^2 = 0.99, P < 10^{-4}$)	$y = -1.67 + 8.58x$ ($R^2 = 0.97, P < 10^{-4}$)	$y = 18.70 - 8.18x$ ($R^2 = 0.99, P < 10^{-4}$)
pH	LpH ₅₀	4.81 (2.77 ~ 24.82)	3.98 (3.67 ~ 4.36)	5.99 (4.56 ~ 8.82)	5.18 (5.05 ~ 5.32)
	LpH ₉₀	9.23(4.30 ~ 92.56)	4.83 (4.41 ~ 5.35)	8.45 (6.12 ~ 13.37)	5.60 (5.45 ~ 5.76)

注: LT₅₀, LT₉₀: 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡时毒液的处理温度; LpH₅₀, LpH₉₀: 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡时毒液提取液的 pH 值。LT₅₀ and LT₉₀: Venom treated temperature inducing 50 and 90% hemocytes mortality; LpH₅₀, LpH₉₀: Venom treated pH inducing 50 and 90% hemocytes mortality.

2.2 酸度

缓冲液 pH 值同样对蠼螋金小蜂毒液生理活性有显著影响。当缓冲液 pH 为 3 时, 毒液基本无生理活性, 当缓冲液 pH 在 5 ~ 8 之间时, 可保证毒液的正常生理活性, 而当缓冲液 pH 达 10 时, 毒液生理活性基本丧失 (图 5-2)。当缓冲液 pH 在 3 ~ 8 之间时, 毒液引起的 Ha 细胞死亡率及缓冲液 pH 值呈正相关 (图 5-3), 处理后 0.5 h, 引起 50%Ha 细胞死亡的毒液所承受的 pH 值最高值为 4.81 (2.77 ~ 24.82), 处理后 4 h, 引起 50%和 90% Ha 细胞死亡的毒液所承受的 pH 最高值为 3.98 (3.67 ~ 4.36) 和 4.83 (4.41 ~ 5.35)。

缓冲液 pH 值对丽蝇蠼螋金小蜂毒液生理活性也有显著影响。当缓冲液 pH 值为 3 时, 毒液生理活性基本丧失; 缓冲液 pH 值达 5 时, 毒液仅存部分生理活性; 缓冲液 pH 值在 6.7 ~ 8 之间时, 可保证毒液有正常生理活性; 缓冲液 pH 值达 10 时, 毒液的生理活性部分丧失 (图 5-1)。当缓冲液 pH 在 3 ~ 8 之间时, 毒液引起的 Ha 细胞死亡率及缓冲液 pH 值呈正相关 (图 5-3)。处理后 0.5 h, 引起 50% Ha 细胞死亡的毒液所承受的 pH 最高值为 5.99 (4.56 ~ 8.82), 处理后 4 h, 引起 50%和 90%Ha 细胞死亡的毒液所承受的 pH 最高值为 5.18 (5.05 ~ 5.32) 和 5.60 (5.45 ~ 5.76)。

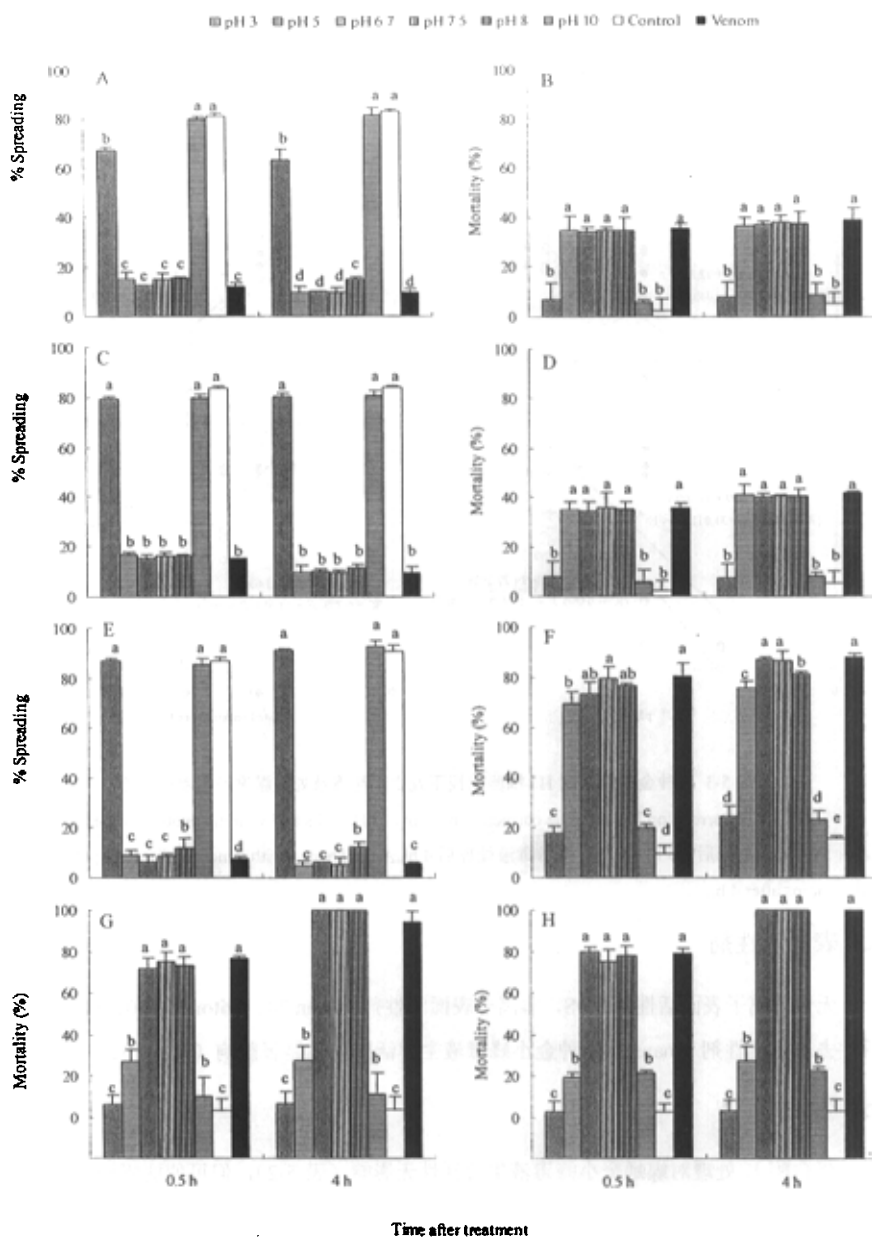


图 5-2 酸度处理对两种金小蜂毒液生理功能的影响

Fig.5-2 Effects of acidity on the physiological functions of *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* venoms
A, B: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展 (A) 和死亡率 (B) 的影响; C, D: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹血细胞延展 (C) 和死亡率 (D) 的影响; E, F: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对 Tn 细胞系延展 (E) 和死亡率 (F) 的影响; G, H: 不同酸度条件下蝶蛹金小蜂毒液 (G) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (H) 对 Ha 细胞系死亡率的影响。A, B: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (A) and mortality (B) of

Pieris rapae hemocytes: C, D: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (C) and mortality (D) of *Papilio xuthus* hemocytes: E, F: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (E) and mortality (F) of Tn cells: G, H: Effects of *Pteromalus puparum* venom (G) and *Nasonia vitripennis* venom (H) treated with different acidity on the mortality of Ha cells.

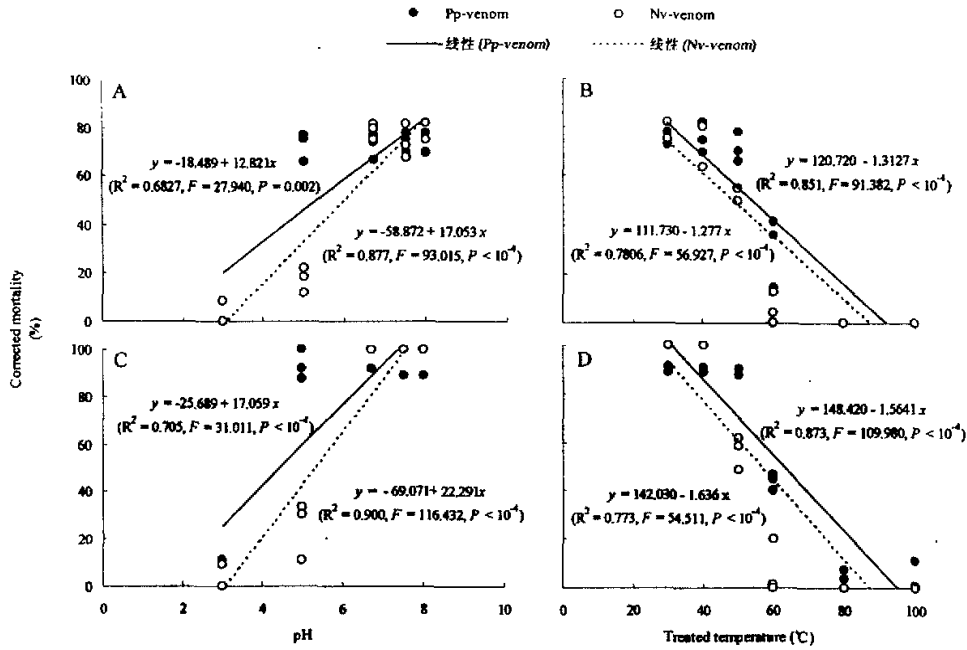


图 5-3 两种金小蜂引起 Ha 细胞的校正死亡率与毒液处理温度及酸度的关系

Fig. 5-3 Correlation between the corrected mortality of Ha cells and venoms treated condition

A, B: 两种毒液处理后 0.5 h; C, D: 两种毒液处理后 4 h. A, B: Treated with venoms after 0.5 h; C, D: Treated with venoms after 4 h..

2.3 表面活性剂

无论阴离子表面活性剂 SDS, 非离子表面活性剂 Tween 20、Triton X-100、NP 40, 还是两性去表面活性剂 Chaps 对两种金小蜂毒液生理活性均无显著影响 (图 5-4)。

2.4 蛋白酶

蛋白酶 K 处理对蝶蛹金小蜂毒液生理活性无影响 (表 5-2), 但可使丽蝇蛹集金小蜂毒液功能部分丧失 (表 5-3)。但是, 胰蛋白酶则可使两种金小蜂毒液活性完全丧失 (表 5-2 和 5-3)。

2.5 盐浓度

缓冲液中盐浓度 (NaCl) 对两种金小蜂毒液生理活性均无显著影响 (表 5-4 和 5-5)。

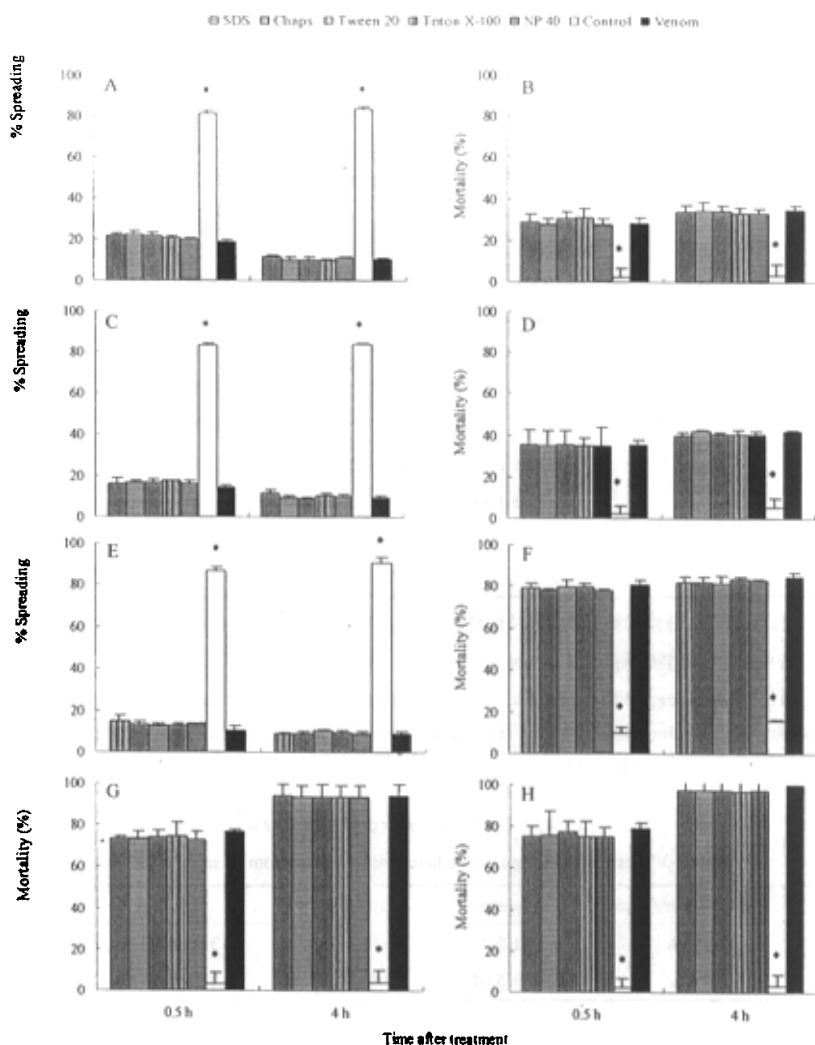


图 5-4 表面活性剂处理对两种金小蜂毒液生理功能的影响

Fig. 5-4 Effects of detergents on the physiological functions of two species of pteromalid venoms

A, B: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展 (A) 和死亡率 (B) 的影响; C, D: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹血细胞延展 (C) 和死亡率 (D) 的影响; E, F: 处理后蝶蛹金小蜂毒液对 Tn 细胞系延展 (E) 和死亡率 (F) 的影响; G, H: 表面活性剂处理后蝶蛹金小蜂毒液 (G) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (H) 对 Ha 细胞死亡率的影响。A, B: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (A) and mortality (B) of *Pieris rapae* hemocytes; C, D: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (C) and mortality (D) of *Papilio xuthus* hemocytes; E, F: Treated *Pteromalus puparum* venom on spreading (E) and mortality (F) of Tn cells; G, H: Effects of *Pteromalus puparum* venom (G) and *Nasonia vitripennis* venom (H) treated with different detergents on the mortality of Ha cells.

表 5-2 蛋白酶处理对蝶蛹金小蜂毒液生理功能的影响

Table 5-2 Effect of proteinase on the functions of venom from *Pteromalus. Puparum*

Cells	Time after treatment	Trypsin	Proteinase K	Control	Venom
Pr (S)	0.5 h	80.11 ± 1.89 a	16.63 ± 1.37 b	81.28 ± 1.41 a	15.36 ± 1.69 b
	4 h	83.73 ± 6.28 a	10.15 ± 1.83 b	83.18 ± 1.03 a	9.46 ± 1.03 b
Pr (M)	0.5 h	3.33 ± 5.77 b	24.09 ± 3.72 a	2.38 ± 4.12 b	25.64 ± 4.44 a
	4 h	3.70 ± 6.42 b	34.19 ± 3.92 a	5.34 ± 4.64 b	36.31 ± 1.03 a
Px (S)	0.5 h	80.72 ± 1.75 a	14.44 ± 0.86 b	83.55 ± 1.07 a	14.72 ± 1.69 b
	4 h	81.69 ± 1.56 a	9.85 ± 0.53 b	84.42 ± 2.54 a	9.35 ± 1.23 b
Px (M)	0.5 h	2.78 ± 4.81 b	33.23 ± 3.18 a	2.22 ± 3.85 b	33.99 ± 1.13 a
	4 h	4.95 ± 4.29 b	39.49 ± 0.89 a	5.34 ± 4.64 b	40.63 ± 4.65 a
Tn (S)	0.5 h	72.82 ± 4.39 b	10.22 ± 1.25 c	87.04 ± 1.57 a	9.72 ± 2.96 c
	4 h	62.12 ± 1.32 b	9.29 ± 1.29 c	90.75 ± 2.48 a	9.15 ± 1.00 c
Tn (M)	0.5 h	30.79 ± 2.81 b	80.04 ± 4.05 a	11.13 ± 0.62 c	81.53 ± 1.68 a
	4 h	36.55 ± 1.13 b	85.83 ± 2.20 a	14.44 ± 1.93 c	86.30 ± 2.80 a
Ha (M)	0.5 h	10.32 ± 3.44 c	57.95 ± 3.55 b	3.33 ± 5.77 c	73.05 ± 1.81 a
	4 h	10.94 ± 3.87 c	67.31 ± 9.31 b	3.70 ± 6.42 c	94.44 ± 4.81 a

注: Pr, Px, Tn 和 Ha 分别示菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞、粉纹夜蛾和棉铃虫细胞系; M: 死亡率; S: 延展率; 同一行中平均数后字母示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。本章中以下表格同之。Note: Pr, Px, Tn and Ha mean hemocytes of *Pieris rapae* and *Papilio xuthus*, cell lines of *Trichoplusia ni* and *Helicoverpa armigera*, respectively; M: Mortality; S: Spreading percent; Means at the same row followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$). The same for the following tables in this chapter.

表 5-3 蛋白酶处理对丽蝇蛹集金小蜂毒液生理功能的影响

Table 5-3 Effect of proteinase on the functions of venom from *Nasonia vitripennis*

Cells	Time after treatment	Trypsin	Proteinase K	Control	Venom
Ha (M)	0.5 h	3.33 ± 5.77 c	43.06 ± 1.20 b	3.33 ± 5.77 c	73.05 ± 1.81 a
	4 h	5.81 ± 5.04 c	54.85 ± 5.01 b	3.70 ± 6.42 c	94.44 ± 4.81 a

2.6 有机溶剂

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液正己烷提取物的水相部分有生物活性, 而有机相无活性, 说明毒液中活性组分是蛋白质, 而非脂类或其它有机物质。氯仿: 乙醇可使两种金小蜂毒液生理活性丧失, 可能与其引起毒液中活性蛋白组分变性有关 (表 5-6 和 5-7)。

2.7 菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物及中肠液

菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物及中肠液均可使两种金小蜂毒液生理活性完全丧失 (表 5-8 和 5-9)。

3 讨论

蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制菜粉蝶蛹血细胞和 Tn 细胞系的延展和存活, 并引起 Ha 细胞的显著死亡。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞和 Tn 细胞系的延展和存活均无显著影响, 但却可引起 Ha 细胞的显著死亡。

表 5-4 盐浓度对蝶蛹金小蜂毒液生理功能的影响

Table 5-4 Effects of salt concentration on the physiological functions of venom from *Pteromalus puparum*

Cells	Time	Salt concentration (mol/L)			Control	Venom
		0.2 M	0.4 M	0.8 M		
Pr (S)	0.5 h	21.15 ± 1.42 b	19.15 ± 1.51 b	20.56 ± 0.43 b	81.28 ± 1.41 a	18.42 ± 1.15 b
	4 h	12.18 ± 1.78 b	11.83 ± 0.62 b	12.62 ± 1.32 b	83.18 ± 1.03 a	10.88 ± 2.58 b
Pr (M)	0.5 h	32.54 ± 3.64 a	30.93 ± 0.28 a	30.46 ± 3.04 a	2.38 ± 4.12 b	31.68 ± 3.66 a
	4 h	36.31 ± 1.03 a	36.56 ± 3.85 a	36.85 ± 1.44 a	5.34 ± 4.64 b	37.26 ± 3.49 a
Px (S)	0.5 h	15.06 ± 0.68 b	16.65 ± 0.66 b	16.40 ± 2.10 b	83.55 ± 1.07 a	15.24 ± 0.71 b
	4 h	9.76 ± 0.62 b	9.73 ± 1.20 b	10.18 ± 1.16 b	84.42 ± 2.54 a	8.96 ± 0.76 b
Px (M)	0.5 h	36.89 ± 3.09 a	37.22 ± 1.39 a	36.85 ± 1.44 a	2.22 ± 3.85 b	37.23 ± 1.39 a
	4 h	40.12 ± 2.68 a	40.04 ± 1.60 a	40.67 ± 2.81 a	5.34 ± 4.64 b	40.77 ± 4.40 a
Tn (S)	0.5 h	10.86 ± 2.01 b	11.52 ± 3.21 b	11.14 ± 3.47 b	87.04 ± 1.57 a	10.24 ± 2.55 b
	4 h	9.15 ± 1.09 b	8.75 ± 1.23 b	9.24 ± 1.54 b	90.75 ± 2.48 a	9.16 ± 1.09 b
Tn (M)	0.5 h	71.05 ± 2.09 a	72.53 ± 3.96 a	79.64 ± 8.04 a	9.97 ± 2.90 b	81.96 ± 2.39 a
	4 h	84.55 ± 2.16 a	83.76 ± 0.74 a	85.29 ± 3.31 a	15.59 ± 2.16 b	85.35 ± 2.63 a
Ha (M)	0.5 h	73.89 ± 0.96 a	72.65 ± 4.64 a	73.08 ± 8.97 a	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
	4 h	95.21 ± 4.18 a	94.19 ± 5.04 a	93.64 ± 5.53 a	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

表 5-5 盐浓度对丽蝇蛹集金小蜂毒液生理功能的影响

Table 5-5 Effects of salt concentration on the physiological functions of venom from *Nasonia vitripennis*

Cells	Time	Salt concentration (mol/L)			Control	Venom
		0.2 M	0.4 M	0.8 M		
Ha (M)	0.5 h	73.41 ± 6.11 a	71.69 ± 8.19 a	71.86 ± 0.75 a	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
	4 h	94.84 ± 4.51 a	94.66 ± 4.64 a	91.16 ± 0.44 a	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

蝶蛹金小蜂毒液以 80℃ 以上温度处理 10 min 后, 毒液生理活性完全丧失, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液有活性的极限温度仅为 60℃。由此可见, 收集两种金小蜂毒液时, 为防止毒液蛋白降解, 故解剖应在冰盒上进行, 而两种金小蜂毒液也有一定的热稳定性, 故生测时, 室温即可进行, 且蝶蛹金小蜂毒液热稳定性要好于丽蝇蛹集金小蜂毒液 (表 4-8)。

当缓冲液 pH 值在 5 ~ 8 之间时, 蝶蛹金小蜂毒液具有正常生理活性, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液作用的最适 pH 值为 6.7 ~ 8。由此可知, 蝶蛹金小蜂毒液对缓冲液 pH 值适应范围更宽一些, 且当缓冲液为弱酸性时能保持其生理活性, 丽蝇集金小蜂毒液作用的适宜缓冲液为中性至碱性, 由双向电泳图 4-2 和 4-3 也可看出这一点。因此在收集两种金小蜂毒液时, 提取缓冲液最好为中性。而我们对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴 pH 值测定表明, 二者的 pH 均

约为 6~7, 故可保证蝶蛹金小蜂毒液保持正常的生理活性。棕尾别麻蝇及家蝇蛹血淋巴 pH 值约为 7.5, 也可保证丽蝇蛹集金小蜂毒液的正常生理功能。

表 5-6 有机溶剂对蝶蛹金小蜂毒液活性的影响

Table 5-6 Effects of organic solvent on activity of *Pteromalus puparum* venom

Organic solvent	Cells	Time after treatment	Aqueous phase	Organic phase	Control	Venom
Hexane extraction	Pr (S)	0.5 h	18.34 ± 1.24 b	80.22 ± 0.94 a	81.28 ± 1.41 a	16.72 ± 1.38 b
		4 h	10.46 ± 1.91 b	83.95 ± 1.97 a	83.18 ± 1.03 a	9.15 ± 0.77 b
	Pr (M)	0.5 h	33.27 ± 2.47 a	2.56 ± 4.44 b	2.78 ± 4.81 b	33.23 ± 3.18 a
		4 h	35.14 ± 1.60 a	3.70 ± 6.42 b	3.03 ± 5.25 b	36.05 ± 2.58 a
	Px (S)	0.5 h	16.70 ± 0.91 b	81.79 ± 2.12 b	81.85 ± 1.41 a	15.58 ± 0.99 b
		4 h	10.11 ± 1.54 b	84.69 ± 1.48 a	84.10 ± 2.21 a	9.87 ± 1.02 b
	Px (M)	0.5 h	34.84 ± 5.45 a	2.56 ± 4.44 b	2.77 ± 4.81 b	34.78 ± 1.27 a
		4 h	40.30 ± 3.46 a	4.79 ± 4.18 b	5.59 ± 4.90 b	42.46 ± 0.29 a
	Tn (S)	0.5 h	12.60 ± 0.96 b	90.30 ± 0.46 a	87.56 ± 2.28 a	12.30 ± 0.84 b
		4 h	9.46 ± 1.35 b	91.57 ± 1.52 a	90.73 ± 2.48 a	8.92 ± 1.09 b
	Tn (M)	0.5 h	81.89 ± 0.71 a	9.73 ± 4.90 b	11.79 ± 0.69 b	81.51 ± 2.87 a
		4 h	85.71 ± 1.57 a	16.47 ± 4.24 b	15.33 ± 2.18 b	85.75 ± 3.05 a
	Ha (M)	0.5 h	74.45 ± 2.79 b	3.33 ± 5.77 c	3.03 ± 5.25 c	73.69 ± 1.18 a
		4 h	94.41 ± 4.90 a	6.11 ± 5.36 c	5.71 ± 5.15 c	96.97 ± 5.25
(2: 1) Chlorform/ methanol extraction	Pr (S)	0.5 h	80.37 ± 2.33 a	79.38 ± 0.52 a	81.28 ± 1.41 a	15.68 ± 0.87 b
		4 h	83.99 ± 2.53 a	83.92 ± 3.13 a	83.18 ± 1.03 a	9.37 ± 3.17 b
	Pr (M)	0.5 h	3.33 ± 5.77 b	6.11 ± 5.36 b	3.03 ± 5.25 b	34.92 ± 1.37 a
		4 h	3.70 ± 6.42 b	6.36 ± 5.53 b	3.70 ± 6.42 b	37.62 ± 6.75 a
	Px (S)	0.5 h	81.63 ± 0.97 a	81.39 ± 2.84 a	81.72 ± 2.91 a	15.26 ± 3.77 b
		4 h	84.15 ± 0.83 a	84.37 ± 2.29 a	84.70 ± 1.78 a	9.60 ± 2.92 b
	Px (M)	0.5 h	2.56 ± 4.44 b	2.78 ± 4.81 b	2.78 ± 4.81 b	34.98 ± 3.90 a
		4 h	5.59 ± 4.90 b	5.41 ± 4.79 b	5.34 ± 4.64 b	40.77 ± 4.40 a
	Tn (S)	0.5 h	88.73 ± 1.30 a	88.80 ± 1.21 a	88.05 ± 1.23 a	11.45 ± 1.22 b
		4 h	90.35 ± 2.66 a	90.55 ± 2.25 a	90.09 ± 2.04 a	8.94 ± 1.41 b
	Tn (M)	0.5 h	11.60 ± 1.00 b	9.76 ± 3.19 b	9.71 ± 3.01 b	82.69 ± 2.87 a
		4 h	14.93 ± 2.97 b	17.68 ± 2.31 b	15.68 ± 0.87 b	86.55 ± 1.46 a
	Ha (M)	0.5 h	5.81 ± 5.04 b	5.34 ± 4.64 b	3.33 ± 5.77 b	73.08 ± 4.88 a
		4 h	6.36 ± 5.53 b	6.94 ± 6.36 b	5.34 ± 4.64 b	97.62 ± 4.12 a

表面活性剂 SDS、Tween 20、Triton X-100、NP 40 和 Chaps 对两种金小蜂毒液活性均无显著影响, 因此在对毒液活性组分进行分离纯化时, 对样品可先以表面活性剂以除去部分杂蛋白, 简化分离过程。

1mg/ml 蛋白酶 K 对蝶蛹金小蜂毒液活性无影响, 但却可使丽蝇蛹集金小蜂毒液的生理活性部分丧失, 1mg/ml 胰蛋白酶会使两种金小蜂毒液活性完全丧失。蛋白酶 K 的作用位点

是丝氨酸位点，故在蝶蛹金小蜂毒液中活性组分的丝氨酸的含量较少，而在丽蝇蛹集金小蜂

表 5-7 有机溶剂对丽蝇蛹集金小蜂毒液活性的影响

Table 5-7 Effects of organic solvent on activity of *Nasonia vitripennis* venom

Organic solvent	Cells	Time after treatment	Aqueous phase	Organic phase	Control	Venom
Hexane extraction	Ha (M)	0.5 h	75.67 ± 5.69 b	3.33 ± 5.77 c	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
		4 h	92.96 ± 6.12 a	4.17 ± 7.22 c	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a
Chlorform/ methanol extraction	Ha (M)	0.5 h	3.70 ± 6.42 a	2.78 ± 4.81 a	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
		4 h	6.94 ± 6.36 a	6.67 ± 5.77 a	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

表 5-8 菜粉蝶幼虫口腔分泌物和中肠液对蝶蛹金小蜂毒液生理活性的影响

Table 5-8 Effects of *Pieris rapae* larvae salivary secretions and mid gut fluid on the functions of the venom from *Pteromalus puparum*

Cells	Treated time	Salivary secretions of <i>Pieris rapae</i> larvae	Control	Midgut fluid of <i>Pieris rapae</i> larvae	Control	Venom
Pr (S)	0.5 h	81.61 ± 2.00 a	81.75 ± 1.84 a	81.90 ± 1.81 a	81.07 ± 1.38 a	15.34 ± 1.70 b
	4 h	84.43 ± 2.76 a	84.51 ± 1.25 a	81.37 ± 0.43 a	83.80 ± 2.14 a	10.47 ± 2.80 b
Pr (M)	0.5 h	2.56 ± 4.44 b	3.03 ± 5.25 b	3.03 ± 5.25 b	2.78 ± 4.81 b	29.46 ± 5.76 a
	4 h	5.81 ± 5.04 b	5.41 ± 4.79 b	5.34 ± 4.64 b	5.15 ± 4.51 b	37.41 ± 6.32 a
Px (S)	0.5 h	82.57 ± 3.48 a	81.69 ± 4.53 a	81.97 ± 2.96 a	81.56 ± 2.70 a	13.56 ± 0.84 b
	4 h	83.58 ± 0.98 a	84.39 ± 2.67 a	83.07 ± 0.70 a	84.95 ± 1.86 a	9.04 ± 2.81 b
Px (M)	0.5 h	2.08 ± 3.61 b	2.22 ± 3.85 b	2.38 ± 4.12 b	2.56 ± 4.44 b	36.17 ± 1.17 a
	4 h	4.79 ± 4.18 a	5.34 ± 4.64 a	4.60 ± 3.99 a	3.03 ± 5.25 b	41.52 ± 2.99 a
Tn (S)	0.5 h	88.60 ± 0.50 a	88.18 ± 0.98 a	88.66 ± 1.50 a	87.95 ± 1.20 a	10.24 ± 2.55 b
	4 h	90.19 ± 1.62 a	91.14 ± 1.82 a	91.38 ± 1.14 a	91.15 ± 1.80 a	9.20 ± 2.97 b
Tn (M)	0.5 h	11.43 ± 4.15 b	9.78 ± 1.83 b	9.57 ± 3.26 b	9.99 ± 2.09 b	85.24 ± 1.72 a
	4 h	16.68 ± 0.87 b	15.68 ± 0.87 b	15.77 ± 1.71 b	15.82 ± 2.73 b	89.35 ± 2.12 a
Ha (M)	0.5 h	2.78 ± 4.81 b	2.56 ± 4.44 b	2.56 ± 4.44 b	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
	4 h	5.81 ± 5.04 b	5.34 ± 4.64 b	6.36 ± 5.53 b	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

表 5-9 菜粉蝶幼虫口腔分泌物和中肠液对丽蝇蛹集金小蜂毒液生理活性的影响

Table 5-9 Effects of *Pieris rapae* larvae salivary secretions and mid gut fluid on the functions of the venom from *Nasonia vitripennis*

Cells	Treated time	Salivary secretions of <i>Pieris rapae</i> larvae	Control	Midgut fluid of <i>Pieris rapae</i> larvae	Control	Venom
Ha (M)	0.5 h	7.04 ± 6.12 b	2.38 ± 4.12 b	6.36 ± 5.53 b	3.33 ± 5.77 b	73.05 ± 1.81 a
	4 h	10.07 ± 1.01 b	5.71 ± 5.15 b	10.28 ± 2.10 b	3.70 ± 6.42 b	94.44 ± 4.81 a

毒液活性组分中丝氨酸含量较高，另一方面可能与处理时间有关，若处理时间延长，蛋白酶

K 可能也会使两种金小蜂毒液的活性部分或完全丧失 (Coudron & Brandt, 1996)。胰蛋白酶专一性强、只断裂赖氨酸、精氨酸的羧基参与形成的肽键, 故两种金小蜂有活性的蛋白组分中赖氨酸或精氨酸可能较高。因此在收集两种金小蜂毒液时, 有必要在提取液中加入蛋白酶抑制剂。

缓冲液盐浓度对两种金小蜂毒液生理活性无影响, 说明毒液中活性组分的溶解性较好, 高盐和低盐缓冲液均可保证其有良好的生理活性, 且当毒液提取液为去离子水时, 毒液的生理活性也不会丧失 (数据未给出), 说明毒液活性组分是非疏水性蛋白。并且在分离纯化蛋白活性组分时, 以 NaCl 梯度洗脱不会破坏其生理活性。

两种金小蜂毒液正己烷提取物水相有生理活性而有机相无生理活性, 氯仿: 乙醇 (2: 1, v/v) 有机相和水相均无生理活性; 说明毒液中活性组分是蛋白, 而非脂类。氯仿: 乙醇可使两种金小蜂毒液生理活性丧失, 可能与其引起毒液中活性蛋白组分变性有关。

菜粉蝶 4 龄幼虫口腔分泌物和中肠液可使两种金小蜂毒液活性完全丧失, 可能与其内丰富的蛋白酶有关, 这些蛋白酶可能对毒液中的活性组分有降解作用。

综上所述, 蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液在提取过程中, 最好于低温下进行, 并加入蛋白酶抑制剂, pH 值最好为 6~8; 在对毒液活性组分进行蛋白分离纯化时, 适宜的缓冲液 pH 范围为 6~8, 操作过程中仪器温度不得高于 60℃ (这基本没问题), 处理过程中可适当使用表面活性剂以除去部分杂蛋白, 但分离过程中流动相最好为非有机溶剂, 洗脱过程中的高浓度 NaCl 溶液不会影响其生理活性。我们已经基本明确蝶蛹金小蜂毒液活性组分为大于 100 kDa 蛋白, 故可先用分子筛进行组分的初步分离, 再通过离子交换对组分作进一步纯化。

第六章 两种金小蜂毒液中酶组成与酶活力变化的时间动态

酶是昆虫 (Schmidt, 1982; King *et al.*, 1984; Piek, 1986)、蜘蛛、蝎子 (Bettini, 1978; Geren & Oedl, 1984) 及蛇 (Iwanaga & Suzuki, 1979) 毒液的主要组分。由于蛇毒、蛛毒及蝎毒材料相对比较容易获得, 且威胁人类的生命安全, 故研究比较系统 (Deshimaru *et al.*, 1996; Assi & Nasser, 1999; Hill & Mackessy, 2000; Kudo & Tu, 2000; Matsui *et al.*, 2000; Veiga *et al.*, 2000; da Silvera *et al.*, 2002)。昆虫毒液中研究的较多的是膜翅目蜂类中针尾部的一些种类, 如蜜蜂 (Habermann, 1971; Banks & Shipolini, 1986), 大黄蜂和胡蜂 (Edery *et al.*, 1978; Nakajima, 1986) 及蚂蚁 (Blum & Hermann, 1978; Schmidt, 1986) 的毒液, 且已明确其中的一些组分, 如溶血肽、磷酸酯酶 A₂, 透明质酸酶等。有关膜翅目昆虫毒液中酶的种类见表 5-1。寄生蜂毒液的研究主要集中于其在调节寄生蜂与寄主关系方面, 对其组分中酶的研究很少, 仅发现外寄生蜂 *Eupelmus orientalis* 毒液中有磷酸酯酶和透明质酸酶活性, 而乏脂酶活性 (Doury *et al.*, 1997; Nakamatsu & Tanaka, 2004), 对其它种类寄生蜂毒液中酶组成的研究尚未见有报道, 且毒液中酶活力在时间序列上变化动态的研究更未有人涉足, 故我们以蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 和丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 为材料开展此方面研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂的来源和饲养方法参见第二章和第三章。

1.2 酶的测定

酶液制备: 蝶蛹金小蜂自雌蜂羽化后 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 d 及丽蝇蛹集金小蜂自雌蜂羽化后 0.5、1、2、3、4、5、6、7 d 分别解剖取样, 每次各取 200 头。取样时, 在 Olympus 解剖镜下, 以尖嘴摄拉出雌蜂生殖系统, 分离出毒器官, 取下毒囊, 在 50 mM TBS (pH 7.4, 50 mM Tris, 1N HCl 调节 pH 至 7.4, 其中含有 0.9% 的 NaCl) 中清洗 3 次, 转移到冰浴中含有 100 μ l TBS 的离心管中, 解剖针刺破毒囊后, 4℃, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清, 调节毒液浓度至 2 VRE/ μ l, 即为毒液酶液, 并用于以下各种酶活力测定。

1.2.1 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶

参照李影林 (1987) 的方法, 以磷酸苯二钠为底物进行。取酶液 10 μ l, 加入缓冲液: 底物液 (1: 1) 190 μ l, 于 37℃ 保温 1 h, 而后加入碱性溶液 400 μ l, 6 g/L 氨基安替吡啉 200 μ l, 24 g/L 铁氰化钾 200 μ l, 混合后以 UV-2550 紫外-可见分光光度计 (Shimadzu 岛津, 日本) 测 OD₅₂₀, 以不加毒液酶液的缓冲液作空白对照, 以苯酚制作标准曲线。

表 5-1 部分膜翅目昆虫毒液中的酶的种类
Table 5-1 Enzymes in venom of Hymenoptera wasps

Species	PLA	HYA	EST	LIP	ALP	ACP	PD	PROT	Reference
Mutillidae 准蜂科									Schmidt <i>et al.</i> , 1986
<i>Dasymutilla tepeletierii</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	
Anthophoridae 条蜂科							-		
<i>Xylocopa virginica</i>	+	+							
Vespidae 胡蜂科									
<i>Polistes infuscantus</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	
<i>P. annularis</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	
<i>Apoica lallens</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Polybia sericea</i>		+	+	+	-	+	-	-	
<i>Brachygastra bilineolata</i>	+	+		+		+	-	-	
<i>Dolichovespula maculata</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	
<i>Vespula squamosa</i>	+	+	+	+		+	-	-	
<i>V. maculifrons</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	
<i>V. prnsylvanica</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	
Formicidae 蚁科									
Ponerinae 猛蚁亚科									
<i>Dinoponera grandis</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	
<i>Platythyrea cribrinodis</i>	+	+	-	+	?	+	-	-	
<i>Paraponera cribrinodis</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	
<i>Ectatomma quadridens</i>	+	+	-	+		+	+	-	
<i>E. tuberculatum</i>	+	+	-		-	+	+	+	
<i>Odontomachus hematodus</i>	+	+	-		-	+	+	-	
Ecitoninae 游蚁亚科									
<i>Eciton burchelli</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	
Pseudomyrmicinae									
<i>Pseudomyrmex mexicanus</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	
Myrmicinae 家蚁亚科									
<i>Pogonomyrmex badius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	
Eupelmidae 旋小蜂科									
<i>Eupelmus orientalis</i>	+	+		-					Doury <i>et al.</i> , 1997
<i>Euplectrus separatae</i>	+	+							Nakamatsu & Tanaka, 2004

注: PLA- Phospholipase A 磷酸酯酶 A; HYA- Hyaluronidase 透明质酸酶; EST- Esterase 酯酶; LIP -Lipase 脂酶; ALP -Alkaline phosphatase 碱性磷酸酶; ACP -Acid phosphatase 酸性磷酸酶; PD- Phosphodiesterase 磷酸二酯酶; PROT -Protease 广谱蛋白酶。

1.2.2 酯酶

参照 Hama 等 (1983) 的方法, 取 20 μl 毒液酶液, 加入 0.5 ml 的 3×10^{-4} M 的 α -醋酸萘酯, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 再加入 0.5 ml 显色剂 (1% 固兰 B 盐: 5% SDS = 2: 5) 终止反应,

10000 rpm 离心 10 min, 上清以 UV-2550 紫外-可见分光光度计 (Shimadzu 岛津, 日本) 测定 OD₆₀₀。以不加毒液酶液的缓冲液作空白对照, 以 α -萘酚制作标准曲线。

1.2.3 广谱蛋白酶

参照王琛柱等(1995)的方法, 略做修改, 氨基磺胺偶氮酪蛋白为底物, 溶于 0.15 M NaCl 中配成底物液, 浓度为 5 mg/ml。取 20 μ l 酶液, 加入 0.3 ml 底物液, 30℃反应 2 h, 最后再加入 0.6 ml 的 2%(w/v)的三氯乙酸终止反应, 4℃ 11200 g 离心 15 min 后, 取上清测 OD₃₆₆。以不加毒液酶液的缓冲液作空白对照, 以胰蛋白酶做标准曲线。

1.2.4 磷酸二酯酶

参照 Schmidt 等(1986)的方法, 对硝基苯磷酸二钠 (PNPP) 为底物, 取 20 μ l 酶液加入 0.5 ml 的 0.1 M Tris-Cl (pH8.9), 0.3 ml 的 1 mM PNPP 和 0.2 ml 蒸馏水, 于 37℃保温 8 h, 最后加入 1.5 ml 的 0.05 N NaOH 终止反应, 测 OD₄₁₀。以不加毒液酶液的缓冲液作空白对照, 以对硝基苯酚做标准曲线。

1.2.5 磷酸酯酶 A

参照 Doury 等(1997)的方法并做改进, 取新鲜鸡蛋 1 个, 去除蛋清和蛋膜, 取蛋黄加 200 μ l 双蒸水搅匀, 取 5 ml 加 10 ml 0.15 M NaCl, 用 NaOH 调节 pH 至 8.0, 备用。配制 1% 的琼脂糖, 加热熔化, 冷却到室温后, 取 20 ml 加入 pH 8.0 的蛋黄液, 倒入干净的直径为 15 cm 培养皿中, 厚度约 5 mm, 凝固后用打孔器打孔, 孔半径为 0.25 cm, 孔间距为 4 cm, 在孔中加入 20 μ l 酶液, 以 TBS 作空白对照, 37℃保温 4 h 后, 测量平板上孔周围清晰斑直径的大小。

1.3 两种金小蜂毒液中可溶性蛋白含量测定

蛋白含量测定采用 Bradford (1976) 的方法。以结晶牛血清白蛋白作标准曲线。

2 结果

2.1 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶

两种金小蜂毒液中的碱性磷酸酶的活力均是在羽化后开始下降, 于羽化后 3 d 达最低, 而后稍有升高, 羽化后 3 d 前蝶蛹金小蜂毒液中碱性磷酸酶活性稍强于丽蝇蛹集金小蜂, 而羽化 3 d 后则恰反之。两种金小蜂毒液中的酸性磷酸酶活性羽化后均呈逐渐下降之趋势。且蝶蛹金小蜂毒液中酸性磷酸酶活性均高于丽蝇蛹集金小蜂。

2.2 酯酶

两种金小蜂毒液中酯酶活性于羽化后开始下降, 羽化后 2 ~ 3 d 达最低, 而后稍升高,

并于羽化后 5~6 d 达一高峰,丽蝇蛹集金小蜂毒液中酯酶活力稍强于蝶蛹金小蜂。

2.3 广谱蛋白酶

丽蝇蛹集金小蜂毒液具广谱蛋白酶的活力,酶活力于羽化后迅速升高,2 d 后达到一稳定水平,直至死亡。蝶蛹金小蜂毒液中则乏广谱蛋白酶活性。

2.4 磷酸二酯酶

两种金小蜂毒液中的磷酸二酯酶的活力均于羽化后开始下降,于羽化后 2~3 d 达一最低水平。之后,丽蝇蛹集金蜂毒液中磷酸二酯酶活力持续升高,于羽化后 7 d 达最高,蝶蛹金小蜂毒液中磷酸二酯酶活力于羽化后 5 d 达一高峰后又开始下降,至羽化后 8 d 达最低。丽蝇蛹集金小蜂毒液中磷酸二酯酶活力在其羽化后 1 d 和 5~7 d 时稍强于蝶蛹金小蜂金小蜂,而羽化后 2~4 d 二者基本相同。

2.5 磷酸酯酶 A

两种金小蜂毒液中磷酸酯酶 A 的活力在蜂羽化初期均较高,而后迅速下降至羽化后 2 d 稳定至某一水平,直至死亡。磷酸酯酶 A 在两种金小蜂毒液中的活力基本相同。

3 讨论

碱性磷酸酶存在于蜜蜂毒液中(Benton, 1967),但收获蚁 *Pogonomyrmex badius* (Schmidt & Blum, 1978 a)和 3 种社会性胡蜂毒液中却乏此酶活性(Hoffman, 1977 a)。Schmidt 等(1986)研究表明,社会性胡蜂毒液中不存在碱性磷酸酶,在收获蚁 *P. badius* 和猛蚁 *Paraponera clavata* 的毒液中有较低的碱性磷酸酶活性,他们认为碱性磷酸酶不是具有针刺作用的膜翅目昆虫的主要酶。

酸性磷酸酶是组织中普遍存在的酶,在昆虫的毒液中也有报道。酸性磷酸酶存在于蜜蜂、大黄蜂 *P. maculifrons*、*Polistes* spp.及收获蚁 *P. badius* 毒液中(Benton, 1967; Hoffman, 1977 a, b, 1978; Schmidt & Blum, 1978 a),本研究中的两种金小蜂毒液中均有碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性,但活力不高。

酯酶存在于蜜蜂(Benton, 1967)、收获蚁 *P. badius* (Schmidt & Blum, 1978 b)及大黄蜂 *P. maculifrons* (Hoffman & Wood, 1984)毒液中,但对其中的酶均未做定量描述。Schmidt 等(1986)对 20 种膜翅目昆虫毒液中酶进行了定量研究,酯酶存在于 6 种昆虫毒液中,包括 4 种社会性蜂类,一种蚂蚁和一种非社会性的胡蜂。酯酶在昆虫毒液中的功能还未知,它与针刺致死无直接关系,但可能与蛰刺后疼痛的产生有关,因这 6 种昆虫的蛰刺均可产生强烈的疼痛。另有研究表明,一些有螫毛的鳞翅目幼虫体内有较高的酯酶活性(Dejong *et al.*, 1975, 1982; Dejong & Bleumink, 1977)。Schmidt 等(1986)的研究还表明,在 20 种膜翅目昆虫中,有酯酶活性的种类则没有蛋白酶活性,三种有蛋白酶活性的毒液中有两种没有酯酶

活性, 我们的研究也表明, 两种金小蜂毒液中均有较弱的酯酶活性, 其中一种毒液有蛋白酶活性, 另一种则乏蛋白酶活性。

广谱蛋白酶在昆虫毒液中存在已经有报道 (Edery *et al.*, 1972; Ishay *et al.*, 1973; Littler *et al.*, 1985), 但活力比较低, 同时也没有排除无关组织的干扰, 如黄蜂毒液中蛋白酶活性是由其它无关组织干扰产生的 (King *et al.*, 1983)。Schmidt 等 (1986) 研究的 18 种膜翅目昆虫毒液中, 仅 3 种有蛋白酶活性。丽蝇蛹集金小蜂毒液中具有蛋白酶活性, 这是比较有意思的现象, 其毒液本就是主要由蛋白组成, 而这些蛋白却没有被其毒液中蛋白酶水解, 可能其毒液中还存在蛋白酶抑制剂来保护毒囊的蛋白, 需做进一步研究。蝶蛹金小蜂毒液中则无蛋白酶活性, 可能与其寄生类型有关, 丽蝇蛹集金小蜂是外寄生蜂, 幼蜂在蝇类围蛹内表皮上吸食寄主血淋巴, 雌蜂产卵时注射毒液进入寄主体内可能有助于幼蜂的取食, 且由毒液中蛋白酶活力变化情况可以推测, 丽蝇蛹集金小蜂的寄生能力与其毒液中蛋白酶活力也有相关性, 这与实际情况也是相符合的, 丽蝇蛹集金小蜂羽化后就可有寄生行为, 而在羽化后 3 ~ 5 d 寄生能力较强, 如营养充足, 雌蜂寄生行为可持续至死亡, 而蝶蛹金小蜂是内寄生蜂, 雌蜂直接产卵于寄主体内, 幼蜂可直接取食寄主体内的营养, 故其毒液中无广谱蛋白酶活性也属正常。

磷酸二酯酶是蛇毒中普遍存在的酶 (Tu, 1977; Iwanaga & Suzuki, 1979), 且广泛存在于组织器官中。Schmidt 等 (1986) 研究的膜翅目 15 属的毒液中, 仅 *Ectatomma* 和 *Paraponera* 毒液具磷酸二酯酶活性, 此两属系姊妹属, 分类上具很近的亲缘关系。磷酸二酯酶在毒液中的功能还不清楚, 可能对毒液中的其它组分的功能有协同作用。本章所研究的两种金小蜂毒液中均具磷酸二酯酶活性, 但功能尚待进一步研究。

磷脂酶 A (phospholipase) 广泛存在于昆虫及其它动物的毒液中, 其活性差异甚大。一般来说社会性胡蜂毒液中的磷脂酶活力较高, 蚂蚁毒液中相对较弱, 磷脂酶 A 有两种类型, 磷脂酶 A₁ 和磷脂酶 A₂, 多数种类为磷脂酶 A₂, 但在 *Polistes germanica* 毒液中为磷脂酶 A₁ (King *et al.*, 1984)。在本实验方法上不能区分磷脂酶 A₁ 和磷脂酶 A₂, 故在此称磷脂酶 A。磷脂酶 A 具有破坏细胞膜上的磷脂层, 增加毒素的渗透力, 干扰细胞膜上的氧化磷酸化作用, 催化天然活性物质(磷酸酰基胆碱、磷酸酰基乙醇以及磷酸酰基丝氨酸)水解, 促使脂肪酸从 B 位置释放, 在线粒体上产生分解能, 使肥大细胞脱粒。磷脂酶 A₂ 是蜜蜂毒液的主要组分之一, 占其毒液总蛋白量的 12%, 蜇刺后 90% 的过敏反应与其相关, 故研究较多。Kuchler 等 (1989) 克隆了意大利蜜蜂毒液中磷脂酶 A₂ 的基因, 并推测其氨基酸序列, 发现它与脊椎动物中的磷脂酶 A₂ 有同源性。Owen 等 (1990) 测定了不同年龄意蜂毒液中磷脂酶 A₂ 的活力。Dudler 等, (1992) 用大肠杆菌表达系统对蜜蜂毒液中的磷脂酶 A₂ 基因进行了高效表达。国内对蜜蜂毒液中的 PLA₂ 也进行了一定的研究, 如沈立荣等 (2002) 成功克隆了意蜂和中蜂毒液中的 PLA₂ 基因。两种金小蜂中的磷脂酶 A 对其寄主来说可能也是一种“过敏原”, 对毒液中抑制寄主免疫的组分起协助作用。

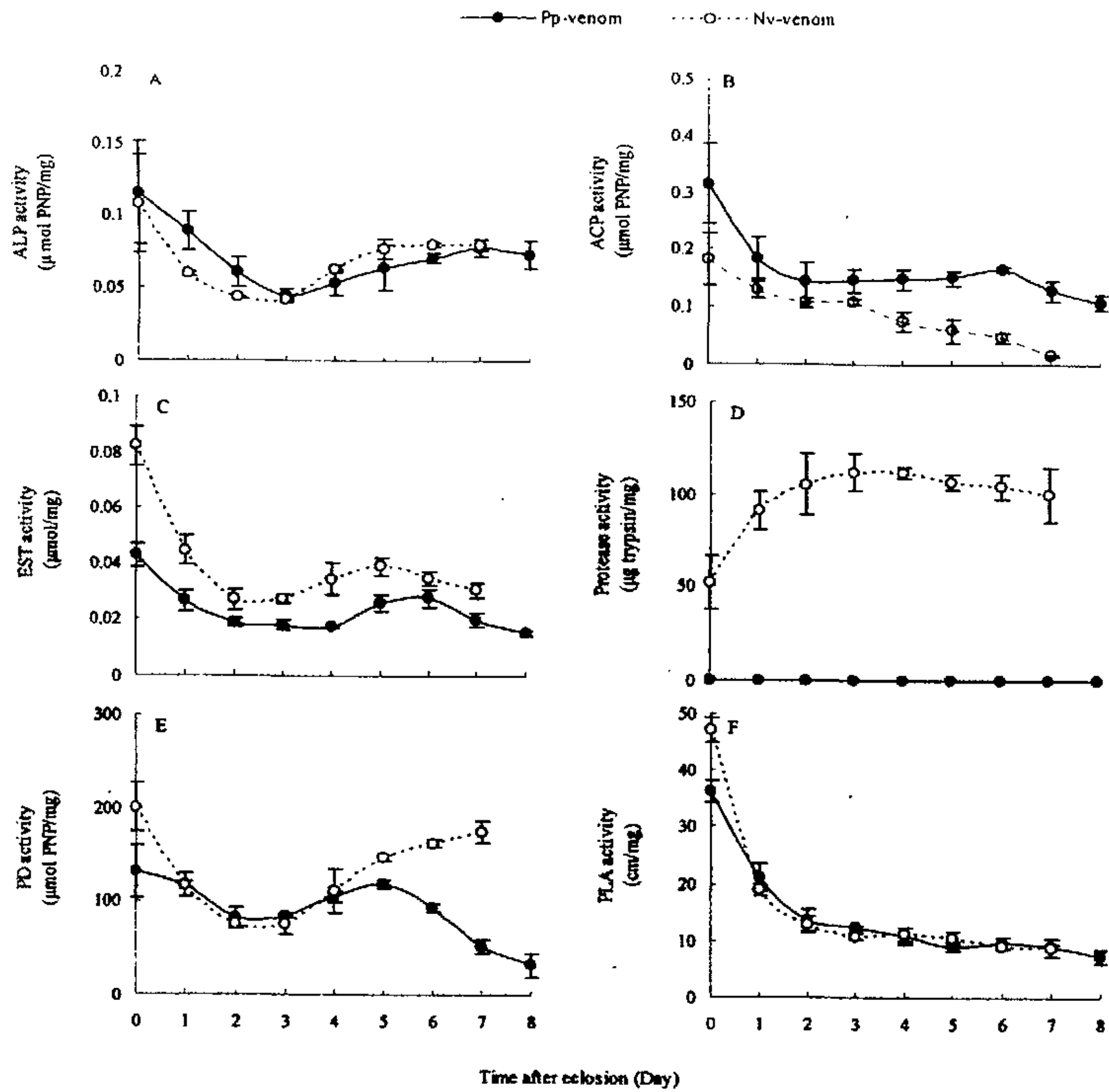


图 5-1 蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液中酶活力比较

Fig. 5-1 Enzyme activity in venom of *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis*

ALP: Alkaline phosphatase 碱性磷酸酶; ACP: Acid phosphatase 酸性磷酸酶; EST: Esterase 酯酶; PD: Phosphodiesterase 磷酸二酯酶; PLA: Phospholipase A 磷酸酯酶 A.

第七章 毒液对菜粉蝶蛹血细胞数量、组成、延展、存活与包裹行为的影响

寄生蜂突破寄主免疫的策略有主动抑制和被动逃避两种方式 (Strand & Pech, 1995), 在主动抑制过程中, 寄生蜂对寄主细胞免疫的主动抑制作用是其卵在寄主体内成功发育的关键。因此, 寄生蜂的寄生或其抑制寄主免疫因子可诱导寄主体内血细胞数量、组成、形态、行为及存活的变化 (杭三保等, 1991; Strand & Noda, 1991; Strand & Pech, 1995; Lavine & Beckage, 1996; Richards & Edwards, 1999, 2000; Cai *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Rivers *et al.*, 2002)。而前人研究均针对一种寄生蜂和一种寄主进行研究, 而未涉及寄生蜂毒液对其非寄主昆虫血细胞数量、组成及存活等方面的影响, 故本章开展此研究。实验中, 我们通过自然寄生和人工微注射毒液的方法, 就两种金小蜂毒液对蝶蛹金小蜂寄主—菜粉蝶蛹血细胞数量、组成、形态、存活及行为进行了系统研究, 以探讨寄生蜂毒液对其寄主和非寄主昆虫细胞免疫的机理, 并进一步明确寄生蜂毒液在对寄主昆虫进行细胞免疫抑制方面的功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂及菜粉蝶来源见第二章和第三章。选取化蛹 0.5 d 以内的菜粉蝶蛹用于试验。

1.2 寄生和毒液注射

菜粉蝶蛹寄生方法见第二章。

对菜粉蝶蛹注射毒液时, 以 Eppendorf 显微注射器将 2 μ l 含 0.5 VRE 的两种金小蜂毒液分别微注射于化蛹后 0.5 d 内的 5 头菜粉蝶蛹体内, 注射伤口涂以凡士林 (BP, UK) 止血, 单头置 1.5 ml 灭菌离心管中, 于 25℃ 培养箱内黑暗状态下保育。设注射 2 μ l TBS 缓冲液的蛹作对照。蝶蛹金小蜂寄生后或注射毒液均可使菜粉蝶蛹的羽化率降至 3% 以下, 但寄生后菜粉蝶蛹死亡率也小于 10%, 注射 TBS 和未寄生蛹的羽化率均高于 90%, 死亡率小于 10%, 说明我们的注射方法在技术上是可行的 (表 7-1)。

表 7-1 寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹羽化率的影响

Table 7-1 Effect of venom on emergence ratio of *Pieris rapae* pupae

	Parasitized	Non-parasitized	Pp-venom	Nv-venom	TBS
% Eclosion	2.41	97.50	2.67	93.33	92.21
Number treated pupae	83	80	75	75	77

1.3 血细胞的分类与计数

分别取寄生或注射后 0.5、1、2、3、4 d 的蛹，以昆虫针刺破蛹，微量移液器吸取 5 μ l 血淋巴，置离心管中，加入 5 μ l 抗凝液（100 ml 蒸馏水中含 NaCl 0.9 g，KCl 0.942 g，CaCl₂ 0.082 g，EDTA 2 g）稀释，混匀后，于相差显微镜下，以血球计数板统计浆血细胞和颗粒血细胞数量（Gupta, 1979）。每次检查菜粉蝶寄生蛹和注射蛹各 5 头，同期未寄生和注射 TBS 的菜粉蝶蛹作对照。

1.4 血细胞延展率和存活率测定

分别取寄生和注射毒液后 0.5、1、2、3、4 d 的菜粉蝶蛹各 3 头，取 10 μ l 血淋巴于 Leica 倒置显微镜下观察、考查延展和未延展的浆血细胞和颗粒血细胞的数量（见图 2-2 A~D）；另取 10 μ l 血淋巴与等体积 0.04% 的台盼蓝溶液（台盼蓝 0.04g 溶于 100mL 生理盐水中）混匀，10 min 后以血球计数板于 Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色（死亡）和未被染色（存活）的浆血细胞和颗粒血细胞的数量，计算血细胞存活率。分别以同期未寄生和注射 TBS 的蛹作对照。

1.5 血细胞包裹作用的测定

分别取寄生和注射蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液后 0.5, 1, 2, 3, 4 d 的菜粉蝶蛹，取血 50 μ l 加到含 50 μ l TC 100 昆虫培养液的 96 孔细胞培养板中（Corning®, USA），于每孔中加入 Sephadex A-50 珠约 30 个，置 27℃ 细胞培养箱中培养约 4 h，取出后根据 Sephadex A-50 微珠表面覆盖的血细胞量及包裹层厚度，将包裹程度分为 5 级（详见图 2-1 所示），计算微珠的包裹指数（参见第二章）。以未寄生和注射 TBS 的同期蛹作对照。

1.6 寄生和注射毒液前后菜粉蝶蛹细胞基因组电泳分析

取寄生和注射毒液后 0.5、1、2、3 和 4 d 菜粉蝶蛹血淋巴，4℃ 1000 g 离心 10 min 后，收集沉淀血细胞，以 V-gene 基因组抽提试剂盒（维特洁，杭州）提取其基因组 DNA，并以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组的完整性。

2 结果

2.1 对菜粉蝶蛹血细胞数量及组成的影响

菜粉蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液后，浆细胞、颗粒血细胞及血细胞总数于处理后 0.5~4 d 与未寄生或注射 TBS 及注射丽蝇蛹集金小蜂毒液的蛹相比均显著升高（图 7-1）。注射蝶蛹金小蜂毒液的菜粉蝶蛹血细胞数量与同期寄生蛹相比差异不显著，注射 TBS 和丽蝇蛹集金小蜂毒液的菜粉蝶蛹血细胞总数与未寄生蛹相比差异也不显著。而就菜粉蝶蛹血细胞日变化趋势来看，各处理蛹血细胞总数均于处理后 2 d 内升高，尔后降低。

菜粉蝶蛹被寄生或注射蝶蛹金小蜂毒液后，其浆血细胞所占比例逐渐降低，未寄生、注射 TBS 或注射丽蝇蛹集金小蜂毒液的菜粉蝶蛹浆血细胞所占比例于 0.5 ~ 3 d 变化不大，到第 4 d 显著下降，颗粒血细胞所占比例的变化恰反之（图 7-2）。寄生和注射蝶蛹金小蜂毒液均可显著降低菜粉蝶蛹浆血细胞的比例，提高颗粒血细胞的比例。

2.2 对血细胞延展及存活的影响

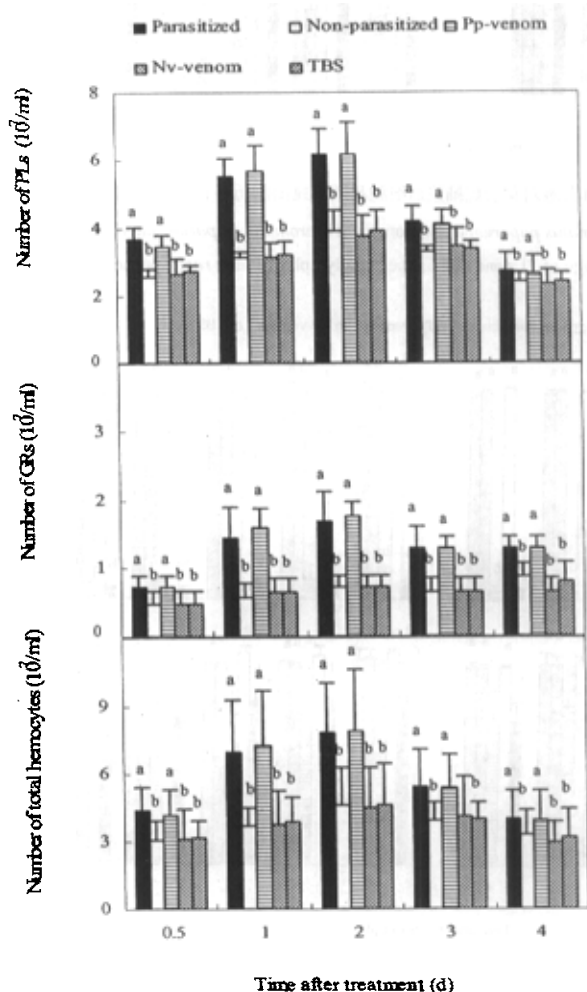


图 7-1 寄生和毒液对菜粉蝶蛹血细胞数量的影响

Fig. 7-1 Effects of parasitization by *Pteromalus puparum* and venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* injection on plasmatocytes, granular cells and total hemocyte counts in the hemolymph of *Pieris rapae* pupae. PLs: 浆血细胞; GRs: 颗粒血细胞. PLs: Plasmatocytes; GRs: Granular cells.

蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液可显著降低菜粉蝶蛹血细胞的延展率。寄生或注射毒液后 0.5 ~ 4 d 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞的延展率均逐渐降低，而未寄生、注射 TBS 或丽蝇蛹集金小蜂毒液蛹浆血细胞和颗粒血细胞延展率则变化不大，蝶蛹金小蜂自然寄生或注射毒液对菜粉蝶蛹血细胞的延展有相似的抑制效应，注射 TBS 或丽蝇蛹集金小蜂毒液后，菜粉蝶蛹血细胞的延展均不受影响（图 7-3）。

蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液还可显著降低菜粉蝶蛹血细胞的存活率。菜粉蝶蛹被寄生或注射毒液后 0.5 ~ 4 d，其血细胞存活率均逐渐下降，而未寄生蛹、注射 TBS 或丽蝇蛹集金小蜂毒液蛹血

细胞的存活率变化不大, 蝶蛹金小蜂自然寄生和注射毒液可对菜粉蝶蛹血细胞的存活产生相同的生理效应, 而注射 TBS 和丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞的存活无显著影响。

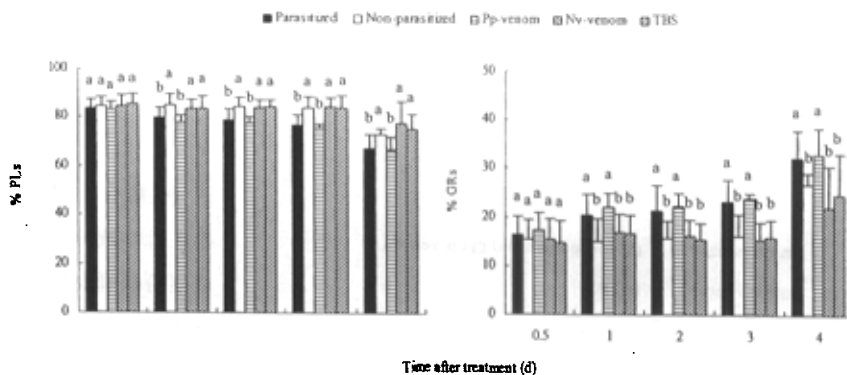


图 7-2 蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞所占比例的影响

Fig. 7-2 Effects of parasitization by *Pteromalus puparum* and venom from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* injection on the percentage of PLs and GRs in the hemolymph of *Pieris rapae* pupae

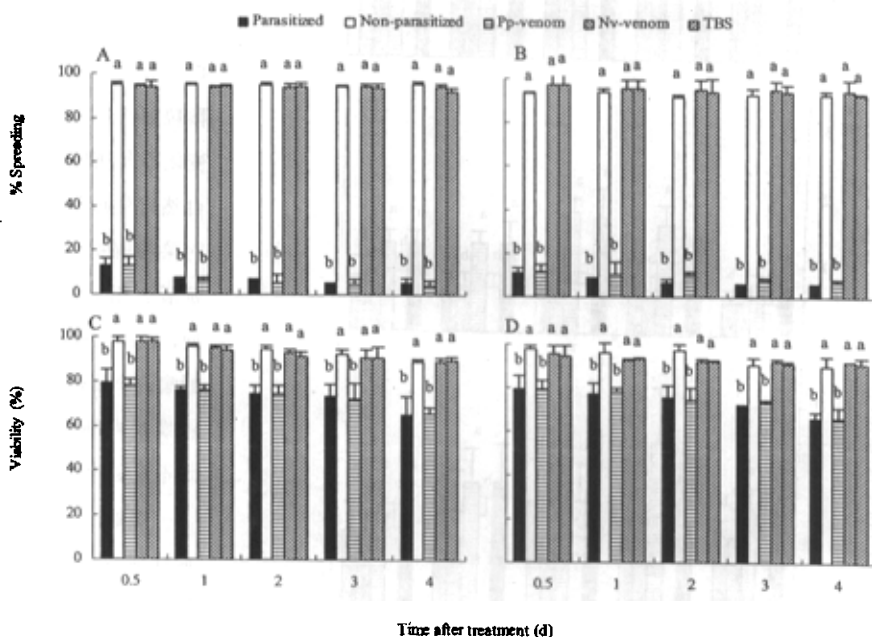


图 7-3 寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展和存活的影响

Fig. 7-3 Effects of parasitization and venom from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* injection on the spreading and viability of hemocytes from *Pieris rapae* pupae

A, C: 浆血细胞; B, D: 颗粒血细胞。A, C: Plasmatocytes; B, D: Granular cells.

2.3 寄生和注射毒液前后菜粉蝶蛹血细胞基因组的电泳分析

寄生和注射毒液前后菜粉蝶蛹血细胞的基因组均很完整，未有发现有 DNA 断裂成相差 200 bp 左右片段的现象，说明蝶蛹金小蜂的寄生或注射其毒液不能诱导菜粉蝶血细胞发生细胞凋亡。

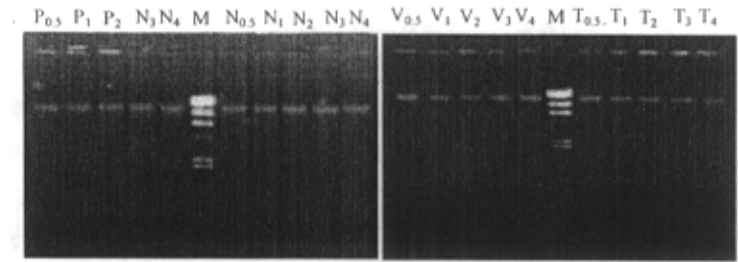


图 7-4 寄生和注射毒液前后菜粉蝶蛹血细胞基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 7-4 Electrophoresis profiles of hemocyte genome DNA from parasitized and non-parasitized, *Peromalus puparum* venom injected and TBS injected *Pieris rapae* pupae

P_{0.5} ~ P₄: 寄生后 0.5 ~ 4 d; N_{0.5} ~ N₄: 0.5 ~ 4 日龄未寄生蛹; M: 标准分子量 Hind III digest λDNA, 分子量由大到小分别为 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 bp. P_{0.5} ~ P₄: Pupae parasitized for 0.5 to 4 days; N_{0.5} ~ N₄: Non-parasitized pupae day-aged 0.5 to 4 days; M: Marker. V_{0.5} ~ V₄: Pupae injected with *Pteromalus puparum* venom for 0.5 to 4 days; T_{0.5} ~ T₄: Pupae injected with TBS for 0.5 to 4 days.

2.4 对血细胞包裹作用的影响

蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液均可显著降低菜粉蝶蛹血细胞对 Sephadex A-50 珠的包裹作用。寄生或注射毒液后 0.5 ~ 4 d 菜粉蝶蛹血细胞的包裹能力逐渐下降，而未寄生或注射 TBS 的对照蛹均在 2 d 前逐渐升高，而后又逐渐降低，包裹能力在化蛹后第 2 d 达最强。蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血细胞的包裹作用有相同的抑制作用，而注射 TBS 对菜粉蝶蛹血细胞的包裹能力无显著影响（图 7-5）。

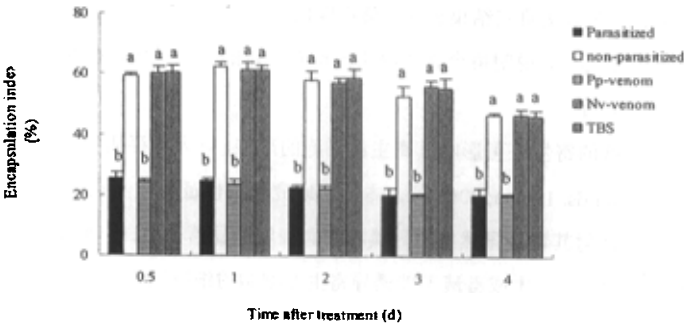


图 7-5 寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血细胞包裹反应的影响

Fig. 7-5 Effects of parasitization and venom injection on the encapsulation capability of *Pieris rapae* pupae hemocytes *in vivo*

3 讨论

蝶蛹金小蜂寄生后 1~4 d, 菜粉蝶蛹血细胞数量显著升高, 浆血细胞所占比例显著下降, 颗粒血细胞所占比例显著上升, 浆血细胞和颗粒血细胞的延展率及存活率显著下降, 包囊能力显著降低, 而注射 0.5 VRE 的毒液后, 可产生与自然寄生相同的生理效应, 进一步证明蝶蛹金小蜂的毒液是对菜粉蝶蛹产生生理效应的主要因子。

寄生蜂的寄生对寄主血细胞数量及组成的影响众说纷纭, 大致可分为三种: 1. 寄生蜂寄生对其寄主血细胞数量及组成无显著影响。Hu 等 (2003) 研究表明, 螟长距茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 的寄生对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 血细胞总量、各类血细胞的数量及血细胞形态和行为均无显著影响, 而寄生蜂主要通过卵表物质被动逃避寄主的免疫反应; 2. 寄生蜂寄生可引起其寄主血细胞数量的下降。Rivers 等 (2002) 研究发现, 麻蝇 *Sarcophaga bullata* 被丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 蛰刺(寄生后去除寄生蜂卵)后 1 h, 血细胞总数及浆血细胞数量均显著下降, 而颗粒血细胞数量则不受影响, 这与自然寄生的情况基本一致, 并且被寄生或蛰刺的麻蝇浆血细胞和颗粒血细胞丧失粘附及延展的能力; 3. 寄生蜂寄生可引起其寄主血细胞数量的增加。杭三保等 (1991) 报道, 二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫被二化螟绒茧蜂 *Apanteles chilonis* 寄生后寄主的血细胞总数明显增高。Strand 和 Noda (1991) 报道, 大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens* 被毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 寄生后血细胞总数明显增高, 且各种血细胞数量也有一定变化。本文的结果与他们的一致, 说明蝶蛹金小蜂寄生引起了寄主的免疫防御反应。

同一种寄主被不同寄生蜂寄生后, 寄主也会有不同的生理反应。如烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 幼虫分别被索诺齿唇姬蜂 *C. sonorensis* 和黑头折脉茧蜂 *C. nigriceps* 寄生后即是如此。该夜蛾幼虫被索诺齿唇姬蜂寄生后, 寄主血细胞总数在寄生后 1~3 d 显著下降, 在寄生后 2 d 浆血细胞含量下降, 颗粒血细胞含量上升; 被黑头折脉茧蜂寄生后, 寄主血细胞总数在寄生后 6~8 d 才显著下降, 整个寄生期浆血细胞和颗粒血细胞含量变化不大 (Davies *et al.*, 1987; Vinson, 1971)。而本文研究结果表明, 菜粉蝶蛹的非自然寄生蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞数量和组成均无显著影响, 说明每个寄生蜂毒液均有一定的作用范围, 对寄主血细胞数量和组成的影响也有特异性。

同时寄生蜂的寄生还可影响其寄主血细胞的形态、行为和存活 (Lavine & Beckage, 1996, Richards & Edwards, 1999 a; 2000 b), 本文的研究结果也证明这一点 (图 7-3 和 7-5)。但蝶蛹金小蜂寄生或注射其毒液虽然能诱导菜粉蝶血细胞的显著死亡, 但血细胞基因组并未发生降解, 说明蝶蛹金小蜂寄生或毒液不能诱导寄主血细胞的细胞凋亡, 这与 Pech 和 Strand (2000) 的研究结果有所不同。蝶蛹金小蜂毒液对寄主血细胞数量和组成的影响、抑制血细胞延展及包囊作用并诱导血细胞死亡的机理尚待进一步研究。

第八章 毒液对蝶蛹金小蜂两种寄主不同虫态血细胞延展、存活与包囊行为的影响

在寄生蜂与寄主在协同进化过程中,形成其特定的寄主范围,且寄生蜂一般只寄生寄主昆虫的某一虫态或某几个特定虫态,其毒液则可抑制寄主其它虫态血细胞的免疫反应(Parkinson & Edwards, 1999 a; Richards & Parkinson, 2000 b)。迄今,虽然这方面已有许多研究,但就寄生蜂类群来看主要限于姬蜂科和茧蜂科,为此,我们特选择隶属金小蜂科的蝶蛹金小蜂及其寄主菜粉蝶蛹为模式系统,就该内寄生蜂如何突破其寄主免疫并对寄主进行营养调控开展系列研究,现已探明了该蜂寄生或假寄生对寄主血细胞组成与可溶性蛋白含量(蔡峻等, 2000, 2001)、体液免疫(Cai *et al.*, 2001)及细胞免疫(Cai *et al.*, 2004)的影响,并通过假寄生初步推定该蜂毒液是其主动抑制寄主蛹血细胞免疫的主要因子(Cai *et al.*, 2004),且通过第二章也证明这一点。在此基础上,本章以丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒液为参照,通过活体微注射和离体培养处理方法,就蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主不同虫态血细胞延展、存活和包囊能力的影响作系统研究,以进一步考证该蜂毒液的生理功能。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

菜粉蝶、柑桔凤蝶、蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂的来源及饲养方法见第二章和第三章。

1.2 毒液提取

毒液提取方法见第二章。

1.3 毒液对寄主血细胞延展和存活影响的测定

1.3.1 活体注射

活体注射及血细胞延展和存活的研究方法参照第七章。

1.3.2 离体培养

血细胞离体培养及血细胞延展和存活的研究方法参照第二章。

1.4 毒液对血细胞包囊作用影响的测定

1.4.1 活体注射

活体注射及血细胞包囊作用的评价方法参照第七章。

1.4.2 离体培养

参照方法第二章 1.4 的方法, 将菜粉蝶和柑桔凤蝶幼虫或蛹血细胞加入含 TC 100 昆虫细胞培养液的 48 孔细胞培养板孔穴中; 再将不同浓度的两种金小蜂毒液提取液按 2 μl 的量分别加入 3 个不同孔穴中, 使有关孔穴中毒液浓度分别调至为 0.002、0.004、0.008、0.016 和 0.02 VRE/ μl ; 最后在每个孔穴中加入 10 粒 Sephadex A-50 微珠, 置 27 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养。同时设加 2 μl TBS 和 10 粒 Sephadex A-50 微珠的作对照。培养、处理 4, 12 和 24 h 后, 参照方法 1.4.1 于 Leica 倒置显微镜下考查各处理孔穴中不同包裹级别的 Sephadex A-50 微珠粒数, 计算包裹指数。

2 结果

2.1 菜粉蝶幼虫和蛹活体血细胞

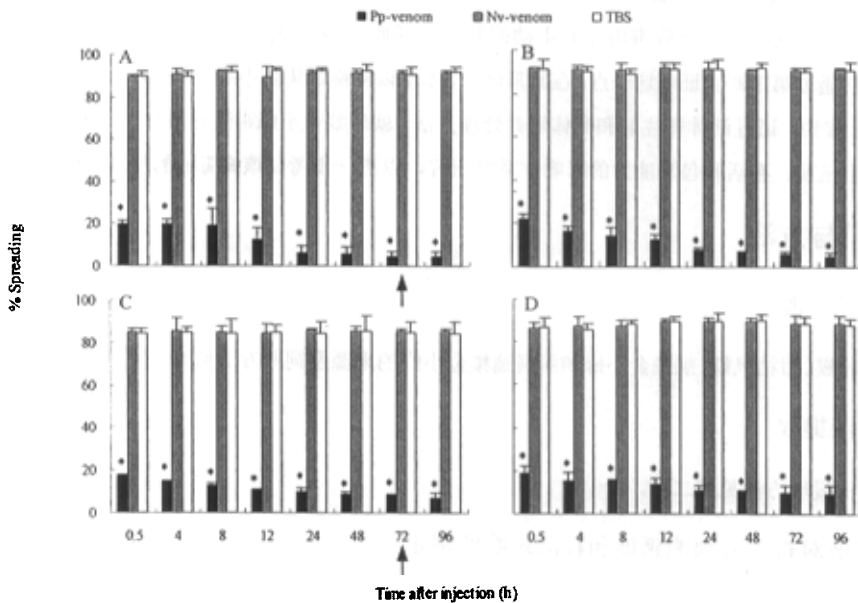


图 8-1 两种金小蜂毒液对活体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-1 Effects of venoms from two species of pteromalid wasps on the spreading of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae in vivo

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞; Pp-venom: 注射蝶蛹金小蜂毒液; Nv-venom: 注射丽蝇蛹集金小蜂毒液; TBS: 注射 TBS 缓冲液。* 示与对照差异达显著 ($P < 0.05$) 水平 (Student's t -检验), 箭头示注射 TBS 和丽蝇蛹集金小蜂毒液的菜粉蝶幼虫化蛹。表 8-2 ~ 4 同之。A, C: PLs and GRs from *Pieris rapae* larvae; B, D: PLs and GRs from *Pieris rapae* pupae; Pp-venom: Injection with *Peromalus puparum* venom; Nv-venom: Injection with *Nasonia vitripennis* venom; TBS: Injection with Tris buffer solution as the control. * Showing significant difference from the control at $P < 0.05$. Arrow shows the *Pieris rapae* 5th instar larvae pupated. The same for table 8-2 ~ 4.

活体注射表明, 蝶蛹金小蜂毒液可抑制菜粉蝶 5 龄幼虫浆血细胞 ($F = 1218.23, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 2911.59, P < 10^{-4}$) 的延展, 注射后时间同样可显著影响菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 24.59, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 4.04, P = 0.01$) 的延展率, 随注射后时间的延长, 两种血细胞的延展率均逐渐下降, 毒液抑制 50% 和 90% 浆血细胞和颗粒血细胞所需时间见表 8-1。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 0.25, P = 0.62$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.004, P = 0.95$) 的延展均无显著影响 (图 8-1 A 和 C)。

蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹活体浆血细胞 ($F = 1302.91, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 2062.97, P < 10^{-4}$) 的延展的也有显著抑制作用。当以 0.5 VRE 的蝶蛹金小蜂毒液注射于菜粉蝶蛹体内后 0.5 ~ 96 h, 浆血细胞和颗粒血细胞的延展率均显著低于注射 TBS 的对照 (图 8-1 B 和 D), 注射后时间对浆血细胞 ($F = 8.69, P = 0.0002$) 和颗粒血细胞 ($F = 16.97, P < 10^{-4}$) 的延展均有显著影响, 两种血细胞的延展率于注射后 0.5 ~ 96 h 逐渐下降。注射丽蝇蛹集金小蜂对菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 1.40, P = 0.24$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.62, P = 0.44$) 的延展均无显著作用 (图 8-1 B 和 D)。就血细胞种类来说, 菜粉蝶蛹和幼虫活体颗粒血细胞比浆血细胞对蝶蛹金小蜂毒液更敏感。而就虫态来说, 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性与菜粉蝶蛹的两种血细胞相当 (表 8-1)。

表 8-1 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主活体血细胞延展的时间效应

Table 8-1 Time effect of *Pteromalus puparum* venom on spreading of two hosts hemocytes *in vivo*

Insect	Cell type	Time effect		
		Equation	IT ₅₀ (h)	IT ₉₀ (h)
<i>Pieris rapae</i> larvae	PLs	$y = 5.84 + 0.35x$ ($r = 0.92, F = 128.58, P < 10^{-4}$)	0.0038 (0.0007 ~ 0.01)	18.09 (9.65 ~ 45.93)
	GRs	$y = 5.91 + 0.19x$ ($r = 0.78, F = 33.31, P < 10^{-4}$)	0.00002 (0.0000 ~ 0.0006)	79.74 (17.45 ~ 3788.56)
<i>Pieris rapae</i> pupae	PLs	$y = 5.82 + 0.35x$ ($r = 0.73, F = 27.24, P < 10^{-4}$)	0.004 (0.00001 ~ 0.03)	20.28 (5.87 ~ 585.45)
	GRs	$y = 5.98 + 0.22x$ ($r = 0.93, F = 132.37, P < 10^{-4}$)	0.00003 (0.0000 ~ 0.0003)	23.15 (12.36 ~ 57.67)
<i>Papilio xuthus</i> larvae	PLs	$y = 6.03 + 0.30x$ ($r = 0.86, F = 65.32, P < 10^{-4}$)	0.0004 (0.00002 ~ 0.002)	6.90 (3.92 ~ 16.20)
	GRs	$y = 5.96 + 0.21x$ ($r = 0.68, F = 19.13, P = 0.0002$)	0.00002 (0.0000 ~ 0.001)	32.28 (7.48 ~ 6040.03)
<i>Papilio xuthus</i> pupae	PLs	$y = 5.96 + 0.25x$ ($r = 0.86, F = 64.90, P < 10^{-4}$)	0.0001 (0.00000 ~ 0.001)	21.03 (9.24 ~ 86.09)
	GRs	$y = 6.01 + 0.24x$ ($r = 0.78, F = 33.52, P < 10^{-4}$)	0.00007 (0.00000 ~ 0.001)	13.21 (5.24 ~ 85.98)

蝶蛹金小蜂毒液还可显著影响菜粉蝶蛹活体浆血细胞 ($F = 130.16, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 66.60, P < 10^{-4}$) 的存活, 注射后时间同样对浆血细胞 ($F = 5.93, P = 0.002$) 的存活有显著影响, 而对颗粒血细胞的存活无显著作用 ($F = 0.943, P = 0.50$); 丽蝇蛹集金小蜂

毒液对菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 0.001, P = 0.98$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.49, P = 0.49$) 的存活均无显著影响 (图 8-2 B 和 D)。蝶蛹金小蜂毒液还可显著降低活体菜粉蝶 5 龄幼虫浆血细胞 ($F = 96.15, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 120.89, P < 10^{-4}$) 的存活率, 注射后时间对浆血细胞的存活有显著影响 ($F = 11.23, P < 10^{-4}$), 而对颗粒血细胞的存活无显著影响 ($F = 2.57, P = 0.06$)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶 5 龄幼虫活体浆血细胞 ($F = 0.07, P = 0.80$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.20, P = 0.66$) 的存活均无显著作用 (图 8-2 A 和 C)。就血细胞种类来说, 活体状态下, 柑桔凤蝶蛹和幼虫颗粒血细胞比浆血细胞对蝶蛹金小蜂毒液更敏感。而就虫态来说, 幼虫浆血细胞和颗粒血细胞对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性与蛹的两种血细胞相当 (表 8-1)。

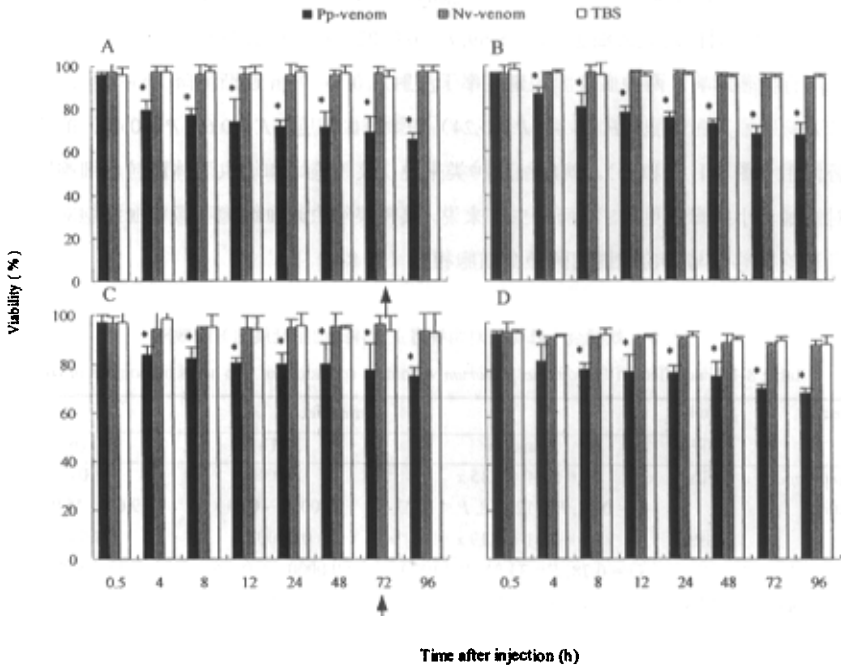


图 8-2 两种金小蜂毒液对活体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-2 Effects of venoms from two species of pteromalid wasps on the viability of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae *in vivo*

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞; Pp-venom: 注射蝶蛹金小蜂毒液; Nv-venom: 注射丽蝇蛹集金小蜂毒液; TBS: 注射 TBS 缓冲液。A, C: PLs and GRs from *Pieris rapae* larvae; B, D: PLs and GRs from *Pieris rapae* pupae; Pp-venom: Injection with *Peromalus puparum* venom; Nv-venom: Injection with *Nasonia vitripennis* venom; TBS: Injection with Tris buffer solution as the control.

2.2 柑桔凤蝶幼虫和蛹活体血细胞

0.5 VRE 蝶蛹金小蜂毒液可显著影响柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 2514.98, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 2285.73, P < 10^{-4}$) 的延展, 注射后时间同样可显著影响浆血细胞 ($F = 10.76,$

$P = 0.0001$) 和颗粒血细胞 ($F = 5.93, P = 0.002$) 的延展, 随注射后时间的延长, 两种血细胞的延展率均逐渐下降, 毒液抑制 50% 和 90% 浆血细胞和颗粒血细胞延展所需时间见表 8-1。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 0.25, P = 0.62$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.24, P = 0.63$) 的延展均无显著影响 (图 8-3 A 和 C)。蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹活体浆血细胞 ($F = 3492.30, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 2667.01, P < 10^{-4}$) 的延展也有显著抑制, 注射后时间同样对浆血细胞 ($F = 16.11, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 4.97, P = 0.004$) 的延展也有显著影响, 随注射后时间的延长, 两种血细胞的延展率逐渐下降, 毒液抑制 50% 和 90% 浆血细胞和颗粒血细胞延展所需时间见表 8-1。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹活体浆血细胞 ($F = 1.13, P = 0.30$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.57, P = 0.45$) 的延展均无显著影响 (图 8-3 B 和 D)。

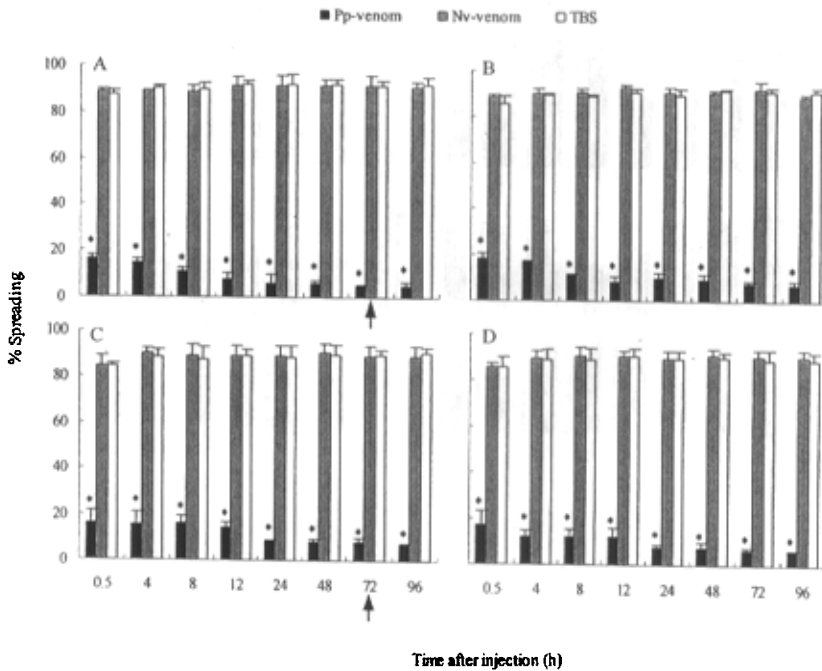


图 8-3 两种金小蜂毒液对活体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-3 Effects of venoms from two species of pteromalid wasps on the spreading of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae *in vivo*

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞; Pp-venom: 注射蝶蛹金小蜂毒液; Nv-venom: 注射丽蝇蛹集金小蜂毒液; TBS: 注射 TBS 缓冲液。A, C: PLs and GRs from *Papilio xuthus* larvae; B, D: PLs and GRs from *Papilio xuthus* pupae; Pp-venom: Injection with *Pteromalus puparum* venom; Nv-venom: Injection with *Nasonia vitripennis* venom; TBS: Injection with Tris buffer solution as the control.

蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 67.39, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 71.95, P < 10^{-4}$) 的存活有显著影响, 注射后时间对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 59.29, P < 10^{-4}$) 和

颗粒血细胞 ($F = 11.12, P < 10^{-4}$) 的存活也有显著影响, 随注射后时间的延长两种血细胞的存活率均显著下降; 丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 0.13, P = 0.79$) 和颗粒血细胞 ($F = 1.49, P = 0.23$) 的延展均无显著影响 (图 8-4 A 和 C)。注射蝶蛹金小蜂毒液还可显著降低柑桔凤蝶蛹浆血细胞 ($F = 81.49, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 54.72, P < 10^{-4}$) 的存活率, 随注射后时间的延长, 浆血细胞 ($F = 10.43, P = 0.0001$) 和颗粒血细胞 ($F = 19.33, P < 10^{-4}$) 的存活率均显著下降; 注射丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹浆血细胞 ($F = 2.97, P = 0.09$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.50, P = 0.49$) 的存活均无显著影响 (图 8-4 B 和 D)。

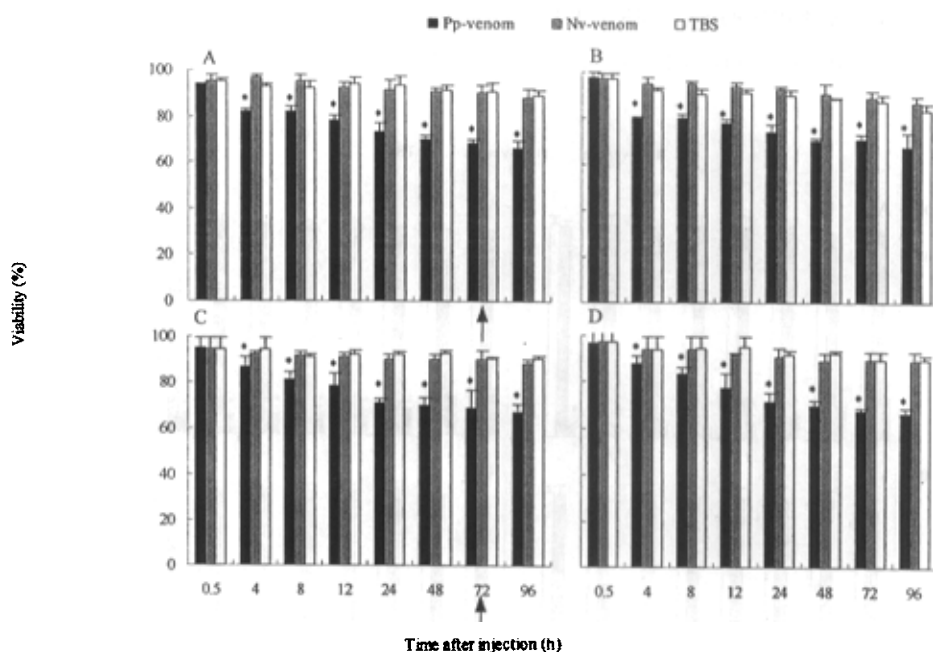


图 8-4 两种金小蜂毒液对活体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-4 Effects of venoms from two species of pteromalid wasps on the viability of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae in vivo

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞; Pp-venom: 注射蝶蛹金小蜂毒液; Nv-venom: 注射丽蝇蛹集金小蜂毒液; TBS: 注射 TBS 缓冲液。A, C: PLs and GRs from *Papilio xuthus* larvae; B, D: PLs and GRs from *Papilio xuthus* pupae; Pp-venom: Injection with *Pteromalus puparum* venom; Nv-venom: Injection with *Nasonia vitripennis* venom; TBS: Injection with Tris buffer solution as the control.

2.3 菜粉蝶幼虫和蛹离体血细胞

蝶蛹金小蜂毒液可显著影响菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 560.78, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 804.05, P < 10^{-4}$) 的离体延展, 颗粒血细胞延展的这种受抑制作用受毒液浓度的显著影响 ($F = 4.84, P = 0.002$), 浆血细胞的延展则不受毒液浓度影响 ($F = 0.17, P = 0.17$)。处

理后时间对浆血细胞 ($F = 107.26, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 36.45, P < 10^{-4}$) 的延展均有显著影响, 随处理时间的延长, 二者延展率均逐渐下降 (图 8-5 A 和 C)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 4.72, P = 0.03$) 和颗粒血细胞 ($F = 5.74, P = 0.02$) 的延展均有显著影响, 且随毒液处理浓度的升高, 浆血细胞 ($F = 14.93, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 14.08, P < 10^{-4}$) 的延展率均呈下降趋势, 处理后时间对浆血细胞的延展率有显著影响 ($F = 3.58, P = 0.04$), 而对颗粒血细胞的延展无显著影响 ($F = 2.05, P = 0.12$) (图 8-6 A 和 C)。

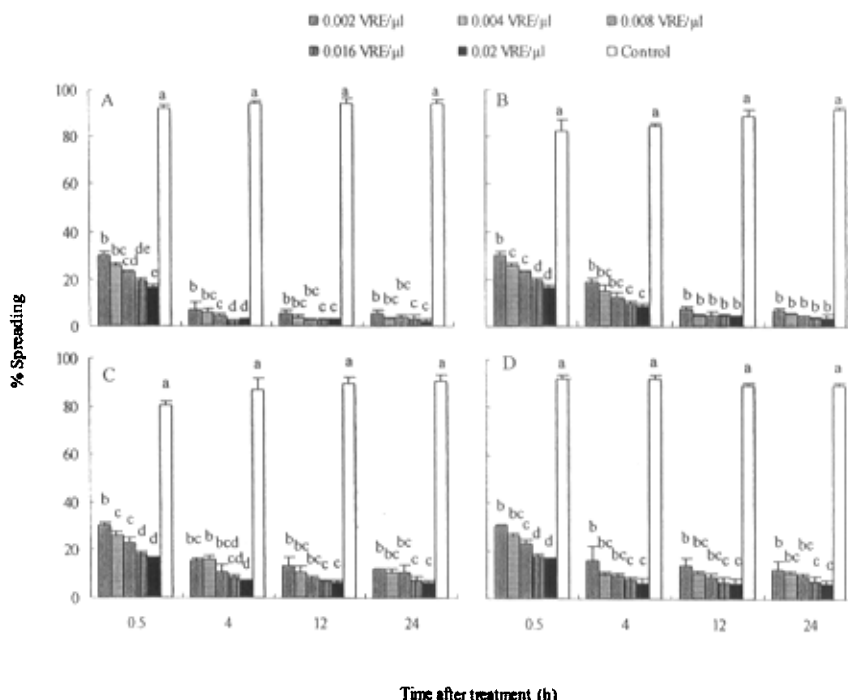


图 8-5 蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-5 Effect of venom from *Pteromalus puparum* on the spreading of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞。A, C: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* larvae; B, D: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* pupae.

蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 634.69, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 96.11, P < 10^{-4}$) 的延展也有显著抑制作用, 且颗粒血细胞受抑制作用对毒液还有浓度依赖效应 ($F = 4.45, P = 0.003$), 而毒液浓度对浆血细胞的延展无显著影响 ($F = 1.09, P = 0.37$), 处理后时间对菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 146.22, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞的延展 ($F = 36.03, P < 10^{-4}$) 均有显著影响 (图 8-5 B 和 D)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 13.71, P = 0.0004$) 的延展有显著影响, 随着毒液浓度的升高浆血细胞 ($F = 28.92, P < 10^{-4}$) 的延展呈下降趋势, 而处理后时间对其延展则无显著影响 ($F = 0.75, P = 0.53$), 丽蝇蛹集金小蜂毒液

对菜粉蝶蛹颗粒血细胞的延展无显著影响 ($F = 2.17, P = 0.14$) (图 8-6 B 和 D)。由毒液对菜粉蝶幼虫和蛹浆血细胞的 IC_{90} 看, 离体培养的菜粉蝶幼虫和蛹浆血细胞和颗粒血细胞的延展对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性基本相同 (表 8-2), 而由 IT_{50} 和 IT_{90} 看, 菜粉蝶蛹浆血细胞要比幼虫浆血细胞敏感 (表 8-3)。

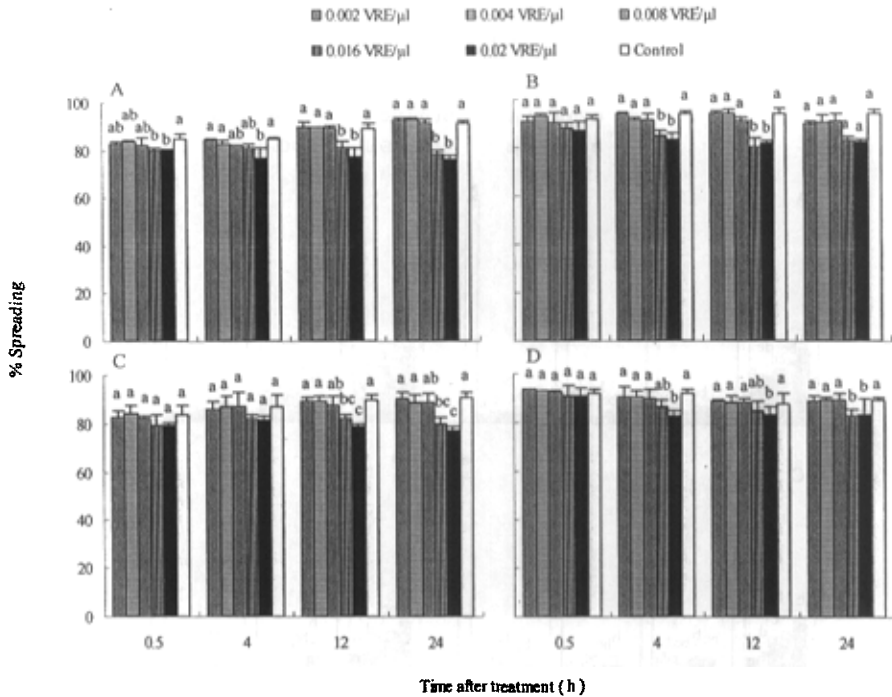


图 8-6 丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-6 Effects of venom from *Nasonia vitripennis* on the spreading of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞. A, C: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* larvae; B, D: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* pupae.

蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 131.70, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 52.00, P < 10^{-4}$) 的存活均有显著影响, 并随毒液处理浓度的升高, 浆血细胞 ($F = 10.92, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 6.20, P = 0.0003$) 的存活均下降, 处理后时间对浆血细胞 ($F = 9.70, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 14.48, P < 10^{-4}$) 的存活均有显著影响, 随处理时间的延长, 二者存活率逐渐下降 (图 8-7 A 和 C)。丽蝇蛹集金小蜂对离体菜粉蝶幼虫浆血细胞 ($F = 0.32, P = 0.57$) 和颗粒血细胞 ($F = 3.00, P = 0.09$) 的存活均无显著影响 (图 8-8 A 和 C)。

蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 182.41, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 56.14,$

$P < 10^{-4}$) 的存活也有显著影响, 且随着毒液处理浓度的升高, 浆血细胞 ($F = 8.85, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 7.45, P = 0.0001$) 的存活率均显著下降, 处理后时间对浆血细胞 ($F = 14.73, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 14.66, P < 10^{-4}$) 的存活也有显著影响。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹浆血细胞 ($F = 0.002, P = 0.97$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.16, P = 0.69$) 的存活均无显著影响 (图 8-7 B 和 D)。

表 8-2 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主离体血细胞延展的剂量效应

Table 8-2 Dose effect of *Pteromalus puparum* venom on spreading of two hosts hemocytes *in vitro*

Insect	Cell type	Venom dose effect		
		Equation	IC ₅₀ (VRE/μl)	IC ₉₀ (VRE/μl)
<i>Pieris rapae</i> larvae	PLs	-	-	-
	GRs	$y = 6.93 + 0.43 x$ ($r = 0.44, F = 13.62, P = 0.0005$)	-	0.03 (0.00001 ~ 0.16)
<i>Pieris rapae</i> pupae	PLs	-	-	-
	GRs	$y = 7.00 + 0.43 x$ ($r = 0.48, F = 17.11, P = 0.0001$)	0.00002 (0.000001 ~ 0.004)	0.02 (0.00001 ~ 0.16)
<i>Papilio xuthus</i> larvae	PLs	$y = 7.15 + 0.40 x$ ($r = 0.62, F = 36.27, P < 10^{-4}$)	-	0.007 (0.00003 ~ 0.04)
	GRs	$y = 6.99 + 0.40 x$ ($r = 0.57, F = 27.72, P < 10^{-4}$)	-	0.01 (0.00000 ~ 0.07)
<i>Papilio xuthus</i> pupae	PLs	$y = 7.48 + 0.54 x$ ($r = 0.63, F = 37.62, P < 10^{-4}$)	0.00002 (0.000001 ~ 0.0008)	0.006 (0.00003 ~ 0.03)
	GRs	$y = 6.82 + 0.34 x$ ($r = 0.66, F = 45.19, P < 10^{-4}$)	-	0.02 (0.0001 ~ 0.10)

表 8-3 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主离体血细胞延展的时间效应

Table 8-3 Time effect of *Pteromalus puparum* venom on spreading of two hosts hemocytes *in vitro*

Insect	Cell type	Pp-venom		
		Equation	IT ₅₀ (h)	IT ₉₀ (h)
<i>Pieris rapae</i> larvae	PLs	$y = 5.75 + 0.61 x$ ($r = 0.90, F = 252.93, P < 10^{-4}$)	0.06 (0.02 ~ 0.12)	7.42 (4.31 ~ 17.16)
	GRs	$y = 5.73 + 0.48 x$ ($r = 0.83, F = 131.81, P < 10^{-4}$)	0.03 (0.003 ~ 0.08)	14.10 (5.89 ~ 81.48)
<i>Pieris rapae</i> pupae	PLs	$y = 5.95 + 0.90 x$ ($r = 0.93, F = 365.97, P < 10^{-4}$)	0.09 (0.06 ~ 0.13)	2.31 (1.83 ~ 3.01)
	GRs	$y = 5.83 + 0.41 x$ ($r = 0.77, F = 85.88, P < 10^{-4}$)	0.009 (0.0002 ~ 0.04)	12.71 (4.93 ~ 108.53)
<i>Papilio xuthus</i> larvae	PLs	-	-	-
	GRs	-	-	-
<i>Papilio xuthus</i> pupae	PLs	$y = 6.12 + 0.31 x$ ($r = 0.64, F = 36.37, P < 10^{-4}$)	0.0003 (0.00001 ~ 0.04)	3.35 (1.56 ~ 15.81)
	GRs	-	-	-

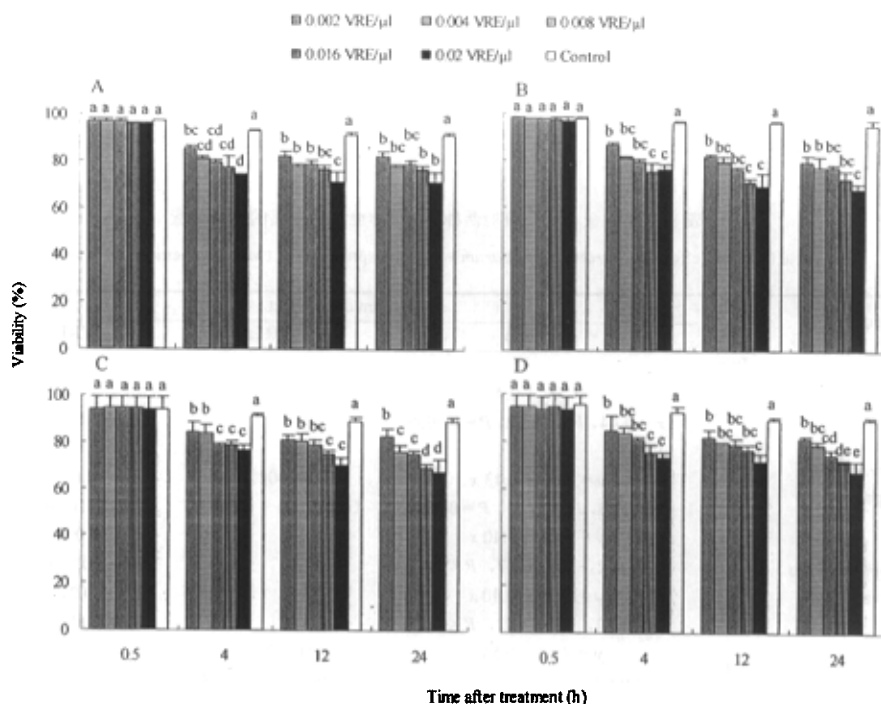


图 8-7 蝶蛹金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-7 Effects of venom from *Pteromalus puparum* on the viability of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞。A, C: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* larvae; B, D: Plasmotocytes and granular cells from *Pieris rapae* pupae.

2.4 柑桔凤蝶幼虫和蛹离体血细胞

蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 2368.55, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 2175.88, P < 10^{-4}$) 的延展也有显著抑制作用, 毒液处理浓度对此也有显著影响 ($F = 9.85, P < 10^{-4}$; $F = 7.64, P = 0.0001$), 而处理后时间对浆血细胞 ($F = 0.20, P = 0.90$) 和颗粒血细胞 ($F = 2.55, P = 0.12$) 的延展均无显著影响 (图 8-9 A 和 C)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 11.14, P = 0.01$) 和颗粒血细胞 ($F = 9.64, P = 0.003$) 的延展同样有显著影响, 但仅当毒液处理浓度大于 $0.016 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ 时, 血细胞的延展才受到显著抑制, 毒液处理剂对此也有显著影响 ($F = 27.63, P < 10^{-4}$; $F = 17.19, P < 10^{-4}$), 处理后时间对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞的延展有显著影响 ($F = 2.98, P = 0.04$), 而对颗粒血细胞的延展无显著影响 ($F = 0.34, P = 0.56$) (图 8-10 A 和 C)。

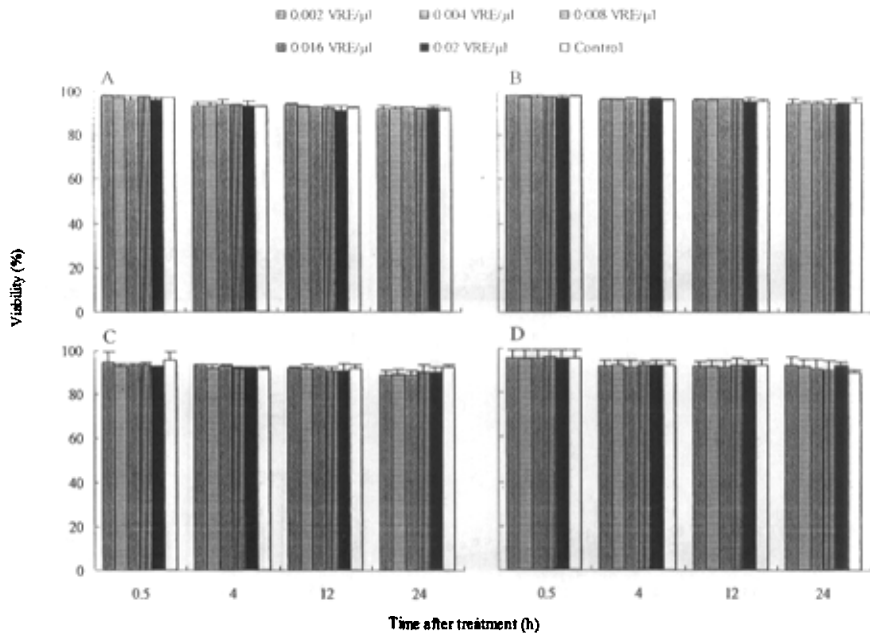


图 8-8 丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-8 Effect of venom from *Nasonia vitripennis* on the viability of hemocytes of *Pieris rapae* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 菜粉蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞。A, C: Plasmatocytes and granular cells from *Pieris rapae* larvae; B, D: Plasmatocytes and granular cells from *Pieris rapae* pupae.

蝶蛹金小蜂毒液对离体培养的柑桔凤蝶蛹浆血细胞 ($F=1547.08, P<10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F=2555.23, P<10^{-4}$) 的延展均有显著抑制作用, 毒液浓度同样可显著影响浆血细胞 ($F=12.30, P<10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F=12.14, P<10^{-4}$) 的延展, 随处理浓度的升高, 血细胞的延展率下降。此外, 处理后时间对柑桔凤蝶蛹颗粒血细胞的延展无显著影响 ($F=0.73, P=0.40$), 而对浆血细胞的延展有显著影响 ($F=8.10, P=0.0001$) (图 8-9 B 和 D)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶蛹浆血细胞 ($F=7.57, P=0.008$) 和颗粒血细胞 ($F=7.38, P=0.008$) 的延展同样有显著抑制作用, 但这种抑制作用并不强, 当以处理最高浓度 $0.02 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ 丽蝇蛹集金小蜂处理时, 两种血细胞的延展率均高于 70%, 而且当处理浓度低于 $0.016 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ 时, 对两种血细胞的延展均无显著抑制作用, 毒液浓度同样可显著影响浆血细胞 ($F=42.83, P<10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F=33.57, P<10^{-4}$) 的延展, 而处理后时间对浆血细胞 ($F=0.83, P=0.37$) 和颗粒血细胞 ($F=2.31, P=0.09$) 的延展均无显著影响 (图 8-10 B 和 D)。由毒液对菜粉蝶幼虫和蛹浆血细胞的 IC_{50} 看, 离体培养的菜粉蝶幼虫和蛹浆血细胞和颗粒血细胞的延展对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性基本相同 (表 8-2)。

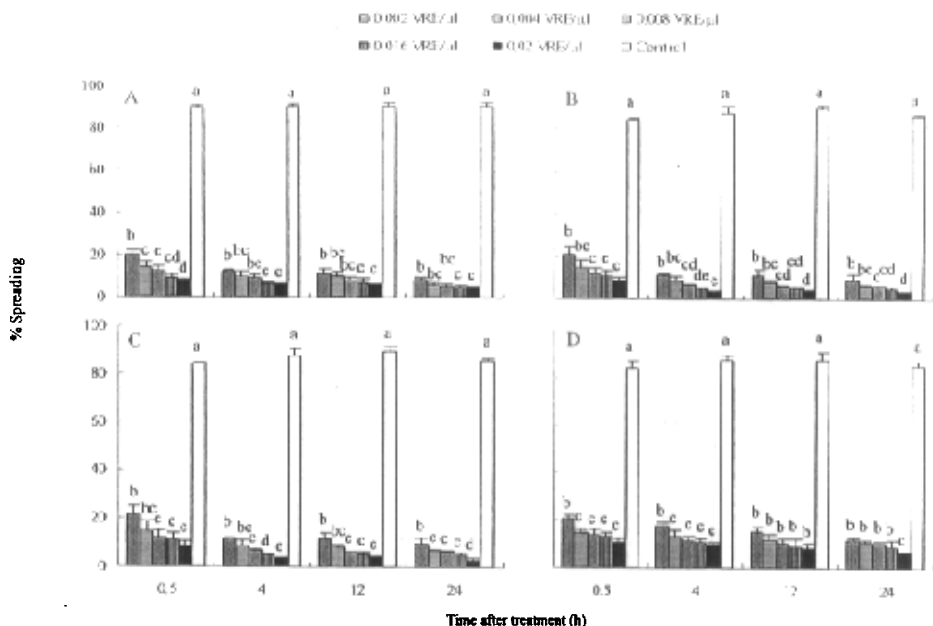


图 8-9 蝶蛹金小蜂毒液对离体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-9 Effect of venom from *Pieromachus puparum* on the spreading of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞。A, C: Plasmatocytes and granular cells from *Papilio xuthus* larvae; B, D: Plasmatocytes and granular cells from *Papilio xuthus* pupae.

蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 15.91, P = 0.0002$) 和颗粒血细胞 ($F = 36.23, P < 10^{-4}$) 的存活同样有显著影响, 毒液处理浓度对颗粒血细胞的存活有显著影响 ($F = 3.85, P = 0.008$), 而对浆血细胞存活则无显著影响 ($F = 2.42, P = 0.06$), 处理后时间对二者的存活均有显著影响 ($F = 50.91, P < 10^{-4}$; $F = 26.08, P < 10^{-4}$), 随处理时间的延长, 浆血细胞和颗粒血细胞的存活率均下降 (图 8-11 A 和 C)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫浆血细胞 ($F = 0.001, P = 0.97$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.02, P = 0.90$) 的存活均无显著影响 (图 8-12 A 和 C)。蝶蛹金小蜂毒液还可显著影响柑桔凤蝶蛹浆血细胞 ($F = 59.80, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 61.38, P < 10^{-4}$) 的离体存活, 并随毒液处理浓度的增加二者存活率均显著下降 ($F = 4.39, P = 0.004$; $F = 4.19, P = 0.005$), 此外, 处理后时间对二者存活率也有显著影响 ($F = 38.57, P < 10^{-4}$; $F = 21.49, P < 10^{-4}$), 并随处理时间的延长存活率逐渐下降 (图 8-11 B 和 D); 丽蝇蛹集金小蜂毒液对柑桔凤蝶浆血细胞 ($F = 0.03, P = 0.87$) 和颗粒血细胞 ($F = 0.000, P = 0.99$) 的存活则无显著影响 (图 8-12 B 和 D)。

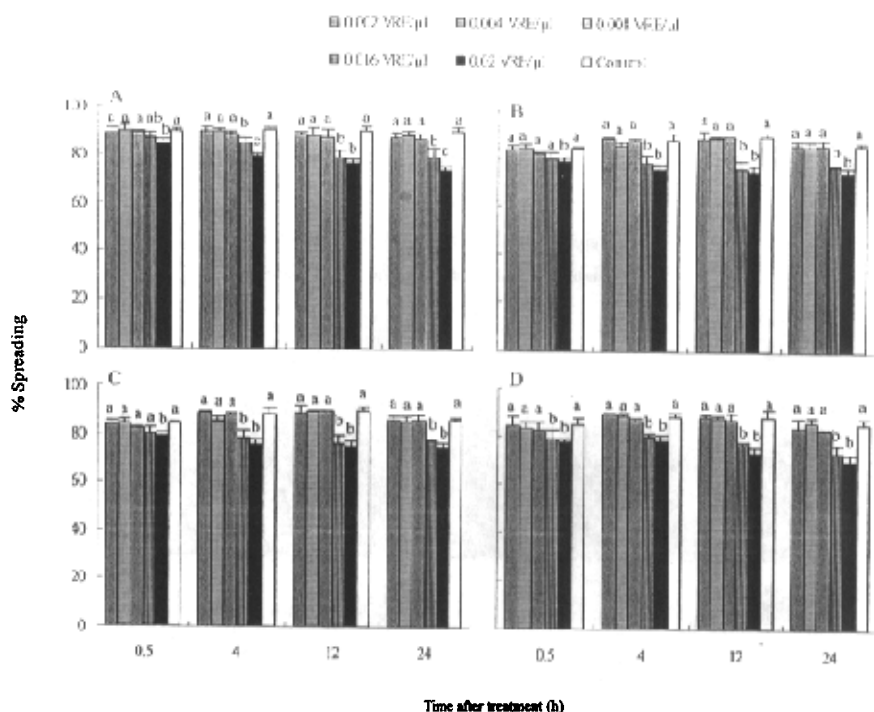


图 8-10 丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞延展的影响

Fig. 8-10 Effects of venoms from *Nasonia vitripennis* on the spreading of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞. A, C: Plasmotocytes and granular cells from *Papilio xuthus* larvae; B, D: Plasmotocytes and granular cells from *Papilio xuthus* pupae.

2.5 菜粉蝶幼虫和蛹血细胞包裹作用

不论在活体还是离体条件下, 菜粉蝶蛹血细胞对异物 Sephadex A-50 微珠均能产生包裹反应, 包裹的程度可依据 Sephadex A-50 微珠表面覆盖的血细胞量及包裹层厚度而分成 5 级, 具体分级标准见第二章。

活体测定结果表明, 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制菜粉蝶幼虫 ($F = 1625.00, P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 2700.13, P < 10^{-4}$) 对 Sephadex A-50 珠的包裹作用。当以蝶蛹金小蜂毒液注射于菜粉蝶幼虫和蛹体内时, 血细胞对 Sephadex A-50 珠的包裹指数显著低仅加 TBS 的对照, 注射毒液浓度对菜粉蝶幼虫 ($F = 12.60, P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 11.68, P < 10^{-4}$) 血细胞包裹 Sephadex A-50 珠的指数具显著影响, 并随注射浓度的提高而下降, 注射后时间则对幼虫 ($F = 0.02, P = 0.98$) 和 ($F = 0.003, P = 1.00$) 蛹血细胞的包裹作用无显著影响 (图 8-13 A 和 C)。丽蝇蛹集金小蜂对活体菜粉蝶幼虫 ($F = 3.56, P = 0.06$) 和蛹 ($F = 0.55, P = 0.73$) 血细胞包裹反应均无显著影响 (图 8-14 A 和 C)。在离体条件下, 蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶幼虫 ($F = 3159.79,$

$P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 2700.13, P < 10^{-4}$) 血细胞的包囊能力有显著抑制作用, 毒液浓度同样可显著影响菜粉蝶幼虫 ($F = 26.89, P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 6.89, P = 0.0003$) 血细胞的包囊能力。处理后时间对菜粉蝶幼虫 ($F = 0.017, P = 0.98$) 和蛹 ($F = 0.06, P = 0.94$) 血细胞的包囊能力无显著影响(图 8-13 B 和 D)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体菜粉蝶幼虫 ($F = 0.69, P = 0.41$) 和蛹 ($F = 0.017, P = 0.98$) 血细胞的包囊能力均无显著影响(图 8-14 B 和 D)。

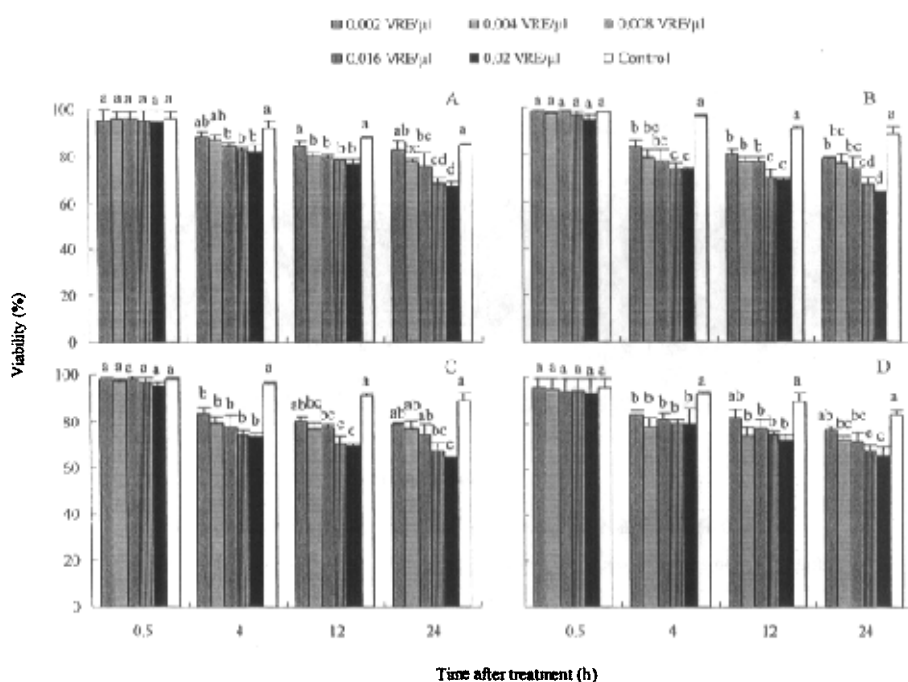


图 8-11 蝶蛹金小蜂毒液对离体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-11 Effects of venoms from *Pteromalus puparum* on the viability of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae in vitro

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞。A, C: Plasmatocytes and granular cells from *Papilio xuthus* larvae; B, D: Plasmatocytes and granular cells from *Papilio xuthus* pupae.

2.6 柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞包囊作用

活体测定结果表明, 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制柑桔凤蝶幼虫 ($F = 939.66, P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 239.23, P = 0.0001$) 对 Sephadex A-50 珠的包囊作用; 注射后时间则对幼虫 ($F = 0.02, P = 0.98$) 和蛹 ($F = 0.02, P = 0.98$) 血细胞的包囊作用均无显著影响; 丽蝇蛹集金小蜂毒液对活体柑桔凤蝶幼虫 ($F = 0.28, P = 0.61$) 和蛹 ($F = 0.28, P = 0.61$) 血细胞包囊反应均无显著影响(图 8-15)。离体条件下, 蝶蛹金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫 ($F = 1850.60, P < 10^{-4}$)

和蛹 ($F = 3175.14, P < 10^{-4}$) 血细胞的包囊能力有显著抑制作用; 毒液浓度同样可显著影响柑桔凤蝶幼虫 ($F = 689.10, P < 10^{-4}$) 和蛹 ($F = 1576.31, P < 10^{-4}$) 血细胞的包囊能力; 而处理后时间对柑桔凤蝶幼虫 ($F = 0.04, P = 0.96$) 和蛹 ($F = 0.02, P = 0.98$) 血细胞的包囊能力无显著影响 (图 8-16 A 和 C); 丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体柑桔凤蝶幼虫 ($F = 0.00001, P = 0.98$) 和蛹 ($F = 0.01, P = 0.92$) 血细胞的包囊能力均无显著影响 (图 8-16 B 和 D)。

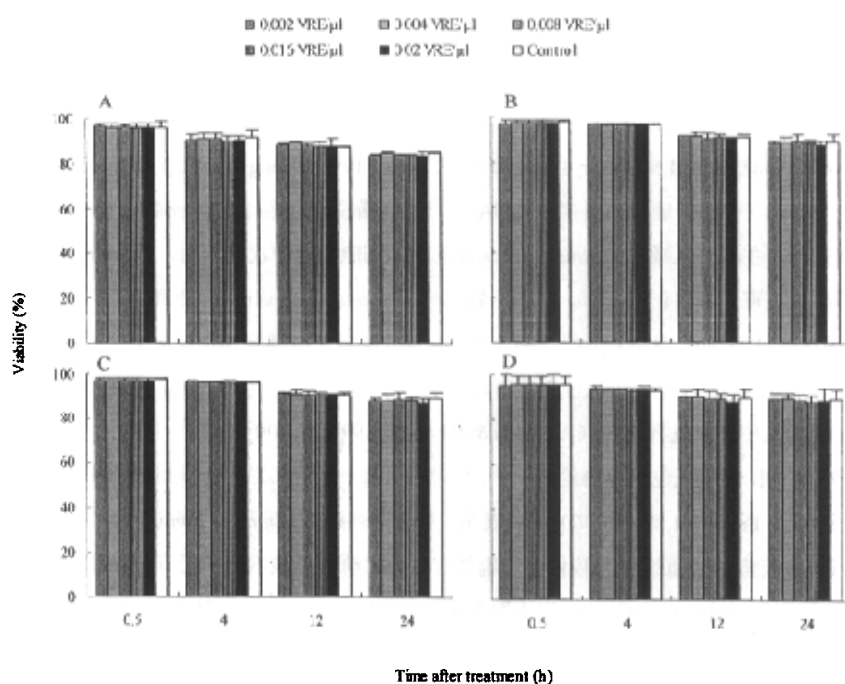


图 8-12 丽蝇蛹集金小蜂毒液对离体柑桔凤蝶幼虫和蛹血细胞存活的影响

Fig. 8-12 Effects of venoms from *Nasonia vitripennis* on the viability of hemocytes of *Papilio xuthus* larvae and pupae *in vitro*

A, C: 柑桔凤蝶幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; B, D: 柑桔凤蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞. A, C: Plasmotocytes and granular cells from *Papilio xuthus* larvae; B, D: Plasmotocytes and granular cells from *Papilio xuthus* pupae.

3 讨论

本研究结果表明, 将蝶蛹金小蜂毒液微注射于寄主活体或用以处理离体培养寄主血细胞, 均能显著影响寄主浆血细胞和颗粒血细胞的存活, 抑制 80% 甚至 90% 以上的寄主浆血细胞和颗粒血细胞的延展, 抑制血细胞的包囊作用。综合分析我们前期 (蔡峻等, 2000; 2001; 2002; Cai *et al.*, 2004) 和第二章的研究结果, 可认为该蜂毒液在抑制其寄主血细胞免疫中起着主导作用。该蜂毒液的这种生理功能与那些不含多分 DNA 病毒的寄生蜂如, 番茄夜蛾

Lacanobia oleracea 蛹期内寄生蜂瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 及麻蝇 *Sarcophaga bullata* 的蛹期外寄生蜂丽蝇蛹集金小蜂的毒液功能相似。其中, 瘤姬蜂的毒液不仅能抑制寄主蛹血细胞包囊作用 (Marris *et al.*, 1999; Parkinson *et al.*, 2002), 而且也能抑制寄主 6 龄幼虫血细胞包囊作用和吞噬作用, 导致血细胞形态变化 (肿胀、脱粒化或产生空泡) 并死亡 (Richards & Parkinson, 2000 b)。但是, 在其他有关寄生蜂研究中, 毒液生理功能并不象上述 3 种蛹期寄生蜂一样, 特别是在那些具多分 DNA 病毒的类群中它们在影响寄主细胞免疫中的作用是相当有限的 (Beckage, 1998; Beckage & Dahlman, 2004)。例如, 在具有多分 DNA 病毒的某些茧蜂中, 该病毒在抑制寄主幼虫细胞免疫中起关键作用, 而毒液仅起增效作用 (Guzo & Stoltz, 1987; Kitano, 1986; Tanaka, 1987 a, b), 其增效的机理可能是促进 PDV 病毒侵入寄主细胞 (Stoltz *et al.*, 1988; Strand & Dover, 1991; Strand & Noda, 1991; Zhang *et al.*, 2004 b)。又如, Webb 和 Luhart (1996) 证实, 具多分 DNA 病毒的索诺拉毁蠋姬蜂 *Campoletis sonorensis* 的毒液在抑制寄主烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 幼虫血细胞免疫中没有作用, 摘除毒囊的雌蜂所产卵仍能在寄主体内正常发育。再如, 姬小蜂 *Eulophus pennicornis* 外寄生番茄夜蛾 5 龄幼虫, 能抑制其寄主血细胞对异物识别与吞噬作用, 抑制浆血细胞和颗粒血细胞延展, 导致这两种血细胞死亡率上升, 但仅注射其毒液时却不能引起相同的生理效应, 即毒液在影响寄主血细胞免疫中并未发挥作用 (Richards & Edwards, 1999 a, 2000 b)。

昆虫在识别、吞噬或包囊异物的过程中, 可能与其浆血细胞和颗粒血细胞表面或释放的某些因子有关。Franchini 等 (1996) 研究表明, 在反吐丽蝇 *Calliphora vomitoria* 中参与吞噬作用或包囊反应的浆血细胞和颗粒血细胞具有与脊椎动物单核细胞和无脊椎动物血细胞化学诱导物 (chemo-attractant)——促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和 α -肿瘤坏死分子 (α -TNF) 类似的免疫反应性物质 (Genedani *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1990; Ottaviani *et al.*, 1995)。Rivers 等 (2002) 推测在麻蝇血细胞中也有类似情况, 故丽蝇蛹集金小蜂毒液要抑制其寄主血细胞免疫, 首先须特异性地作用于在识别异物、血细胞聚集过程中起关键作用的浆血细胞, 抑制浆血细胞化学诱导物的激活。而蝶蛹金小蜂毒液作用于其寄主浆血细胞和颗粒血细胞是否有类似情况尚不明确, 有待深入研究。此外, 我们仅探讨了蝶蛹金小蜂毒液粗提液的生理功能, 但究竟是毒液中何种组分还是几种组分共同作用的结果尚不明了, 有待在纯化毒液各组分的基础上做进一步的研究。

综上所述, 寄生蜂毒液的生理功能因寄生蜂类群及其寄生的寄主虫态而异, 这可能是寄生蜂与寄主间协同进化的结果。因此, 我们在研究寄生蜂突破寄主免疫机理时应因所研究的寄生蜂-寄主体系而全面评价有关寄生蜂抑制寄主免疫有关因子的单独作用及各因子的相互关系, 进而再综合分析、评判其中的关键因子。蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制其自然寄主菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹的血细胞免疫, 但与蝶蛹金小蜂同隶属金小蜂科的丽蝇蛹集金小蜂的毒液在低浓度时就可明显抑制其自然寄主麻蝇的血细胞免疫 (Rivers *et al.*, 2002), 但仅在高浓度时 (处理浓度大于 $0.016 \text{ VRE}/\mu\text{l}$) 对非自然寄主菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞的延展有抑制作

用,且这与具外寄生性的啮小蜂 *Melittobia digitata* 毒液对其非自然寄主麻蝇离体浆血细胞和颗粒血细胞存活、粘着、延展以及形态无任何作用 (Rivers *et al.*, 2002) 的结果相似。可见,寄生蜂毒液抑制寄主免疫具有寄主的种特异性,这也可能就是某种特定寄生蜂均具有其特定寄主范围的原因所在。

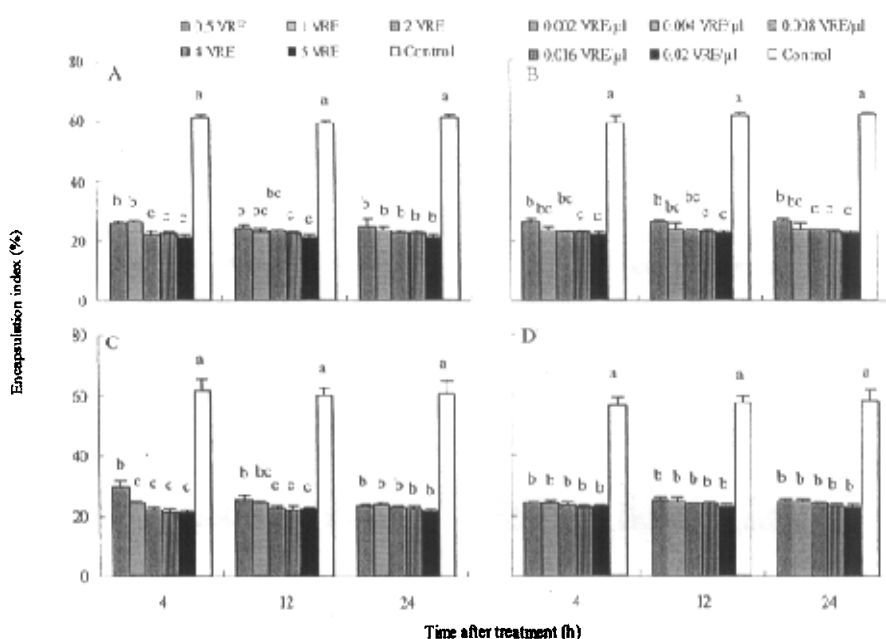


图 8-13 蜂蛹金小蜂毒液对活体和离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞包裹作用的影响

Fig. 8-13 Effects of venom from *Pteromalus puparum* on the encapsulation capability of hemocytes from *Pieris rapae* larvae and pupae *in vivo* and *in vitro*

A, B: 菜粉幼虫活体和离体血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹作用; C, D: 菜粉蛹活体和离体血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹作用。A, B: The encapsulation index of hemocytes from *Pieris rapae* larvae to Sephadex A-50 *in vivo* and *in vitro*; C, D: The encapsulation index of hemocytes from *Pieris rapae* pupae to Sephadex A-50 *in vivo* and *in vitro*.

昆虫防卫寄生蜂的最主要的免疫反应是包裹作用,而这种包裹作用的效率取决于寄主体内血细胞的数量和延展能力(Ratcliffe & Rowley, 1987; Strand & Pech, 1995; Beckage, 1998; Shelby & Webb, 1999)。PDV 是对寄主血细胞的活动性有显著抑制作用的物质(Beckage, 1998),因此在含有 PDV 的寄生蜂中,抑制寄主免疫的主要因子是 PDV,如索诺姬蜂 *Campoletis sonorensis* (含 PDV) 的毒液在其寄生过程中不起任何作用(Webb & Luckhart, 1994)。而在不含 PDV 的寄生蜂如瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 的毒液可有效抑制寄主番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 的血细胞的包裹反应(Richard & Parkinson, 2000),这与我们的研究结果相似,进一步研究表明,瘤姬蜂 *P. hypochondriaca* 毒液抑制其寄主血细胞发生包裹反

应的蛋白组分为 28 和 32 kDa 蛋白 (Parkinson *et al.*, 2002), 而蝶蛹金小蜂中抑制寄主血细胞包囊反应的蛋白组分的分离纯化可做进一步研究。丽蝇蛹集金小蜂毒液对其非寄主昆虫菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞的包囊反应均无显著抑制作用, 进一步证明寄生蜂毒液的作用有一定的范围。

实验中发现, 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制菜粉蝶和柑桔凤蝶幼虫活体和离体浆血细胞和颗粒血细胞的延展及包囊能力, 却极少寄生此两种昆虫的幼虫, 说明菜粉蝶和柑桔凤蝶幼虫体表不具供蝶蛹金小蜂进行寄主搜寻定位的信息化合物, 或两种寄主的幼虫体内营养不适合蝶蛹金小蜂卵孵化及幼虫发育, 抑或蝶蛹金小蜂毒液中缺乏可抑制菜粉蝶或柑桔凤蝶幼虫动作反应的麻痹组分, 可能是菜粉蝶和柑桔凤蝶幼虫不被蝶蛹金小蜂寄生的原因所在。

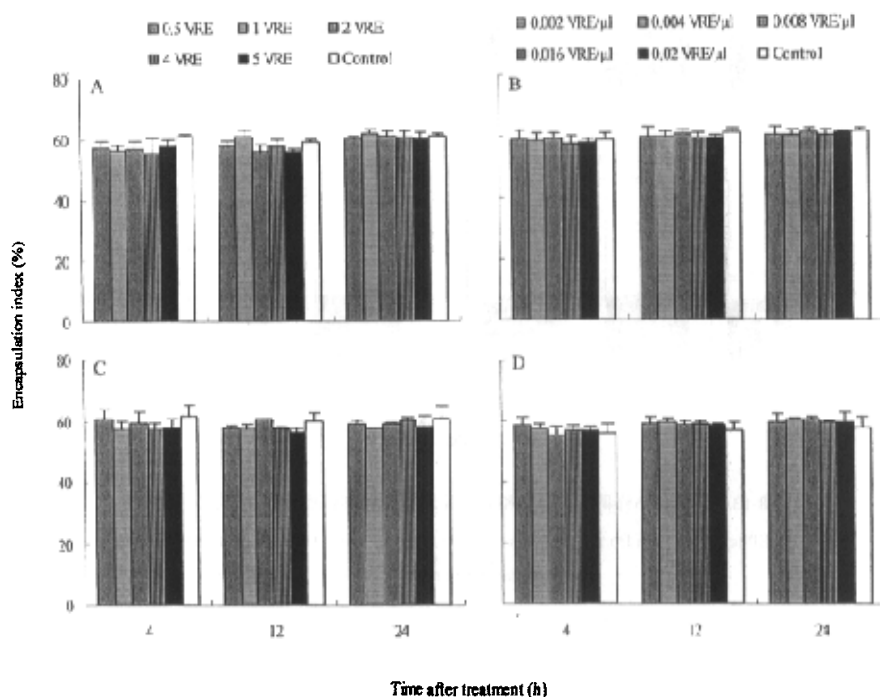


图 8-14 丽蝇蛹集金小蜂毒液对活体和离体菜粉蝶幼虫和蛹血细胞包囊作用的影响

Fig. 8-14 Effects of venom from *Nasonia vitripennis* on the encapsulation capability of *Pieris rapae* larvae pupae hemocytes *in vivo* and *in vitro*

A, B: 菜粉幼虫活体和离体血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包囊作用; C, D: 菜粉蛹活体和离体血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包囊作用。A, B: The encapsulation index of hemocytes from *Pieris rapae* larvae to Sephadex A-50 *in vivo* and *in vitro*; C, D: The encapsulation index of hemocytes from *Pieris rapae* pupae to Sephadex A-50 *in vivo* and *in vitro*.

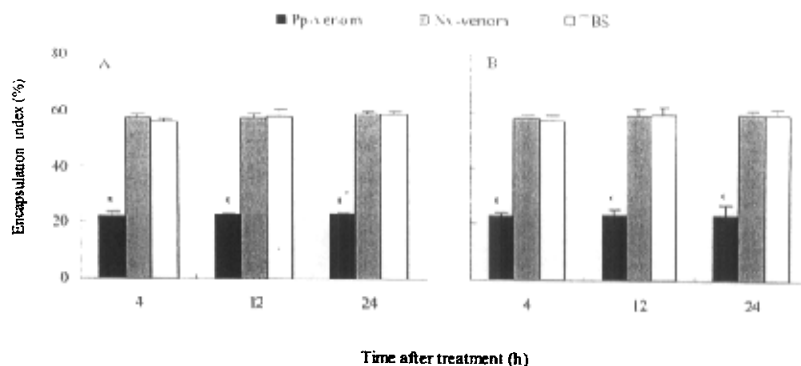


图 8-15 两种金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫 (A) 和蛹 (B) 活体包裹反应的影响

Fig. 8-15 Effects of venoms from two Pteromalid wasps on the encapsulation capacity of hemocytes from *Papilio xuthus* larvae (A) and pupae (B) *in vivo*

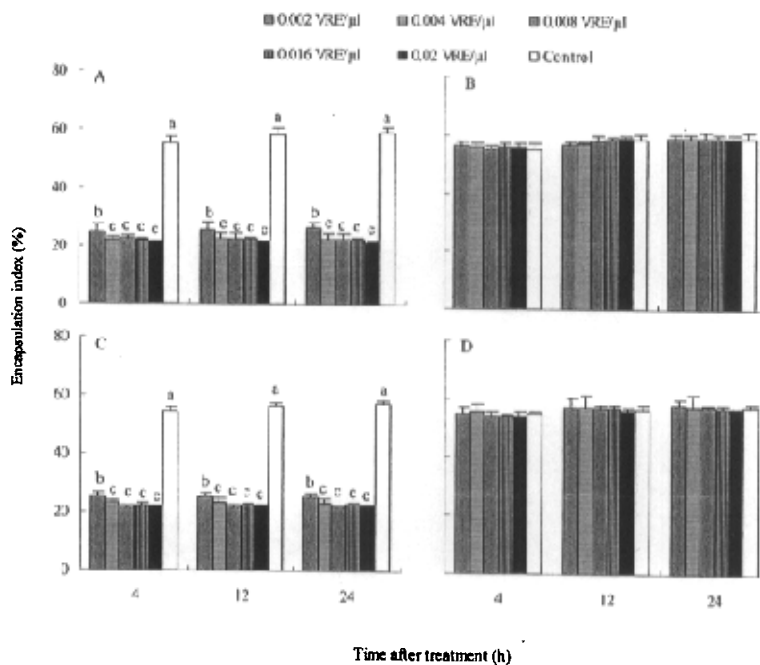


图 8-16 两种金小蜂毒液对柑桔凤蝶幼虫和蛹离体包裹反应的影响

Fig. 8-16 Effects of venoms from two Pteromalid wasps on the encapsulation capacity of hemocytes from *Papilio xuthus* larvae and pupae *in vitro*

A, B: 对柑桔凤蝶幼虫离体包裹反应的影响; C, D: 对柑桔凤蝶蛹离体包裹反应的影响。A, B: Effects of venoms from two Pteromalid wasps on the encapsulation capacity of hemocytes from *Papilio xuthus* larvae *in vitro*; C, D: Effects of venoms from two Pteromalid wasps on the encapsulation capacity of hemocytes from *Papilio xuthus* pupae *in vitro*.

第九章 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主血细胞酚氧化酶活性及血淋巴黑化作用的影响

昆虫体内的黑化作用参与卵壳和表皮的形成 (Hopkins & Kramer, 1992)、伤口愈合及对侵染物的黑化包裹作用 (Gillespie *et al.*, 1997)。其中对黑化过程中的关键酶是酚氧化酶, 酚氧化酶是原酚氧化酶通过级联反应激活后的产物, 在此过程中伴随产生的黑化素及其它有毒酚类是对入侵物最主要的防御物质 (Ashida & Brey, 1998; Vass & Nappi, 2000), 因此寄生蜂对寄主体液免疫的调控作用可能是通过调节酚氧化酶的级联反应实现的。

寄生蜂对寄主酚氧化酶的调控作用已经做了不少的研究 (Lavine & Beckage, 1995; Nappi & Christensen, 2005)。在拥有多分DNA病毒的茧蜂科和姬蜂科中, 多分DNA病毒是调控寄主酚氧化酶的主要因子 (Beckage *et al.*, 1990; Shelby *et al.*, 2000; 尹丽红, 2001; 白素芬等, 2003), 但有时毒液也会起主要作用 (Asgari *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004 a), 在不含多分DNA病毒的瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液中发现了酚氧化酶活性的抑制因子 (Parkinson & Weaver, 1999)。

尽管 Cai 等 (2001) 研究表明, 菜粉蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 血淋巴中酚氧化酶活性有所升高, 但这种活性的升高是否会引起其血淋巴黑化能力的增强? 蝶蛹金小蜂毒液对血淋巴黑化作用又有何调控作用? 还未有研究。且酚氧化酶存在于血细胞和血浆中 (Brehelin *et al.*, 1989; 尹丽红, 2001), 而血细胞在血浆黑化过程中又有何作用? 这都未有报道。故我们对此做了研究, 明确蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血淋巴黑化作用的调控作用及蝶蛹金小蜂的突破寄主体液免疫的机理。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

菜粉蝶、柑桔凤蝶和蝶蛹金小蜂的来源及饲养方法见第二章。

1.2 毒液微注射

毒液微注射方法参见第七章。

1.3 血淋巴的取样

寄生或注射毒液后的菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹以解剖针刺破翅芽处体壁, 以微量移液枪吸取流出的血淋巴。血淋巴一部分以 1000 g 离心 10 min, 上清即为血浆, 立即用于试验; 另一部分直接用于试验。

1.4 血细胞的酚氧化酶染色

参照 Lanz 等 (1993) 的方法。分别取寄生和注射后 0.5、1、2、3、4 d 的菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴, 1000 g 离心 10 min 后, 血细胞悬浮于 PBS (0.01 M, pH 7.0) 中, 洗涤 3 次后, 加到凹玻片中, 并于室温黑暗条件下, 保育 30 min 使细胞贴壁, 再用 0.02 M 的 PBS (pH 7.0, 含 10% 福尔马林) 固定 1 h, 室温于 2 mg/ml 的 D, L-DOPA 中孵育 10 h 后, 在倒置显微镜下观察, 细胞染成棕黑色即计数为染色 (见图 9-1), 分别计数染色和未染色血细胞数目, 计算血细胞染色率, 血细胞染色率高低反映血细胞酚氧化酶活性的强弱。

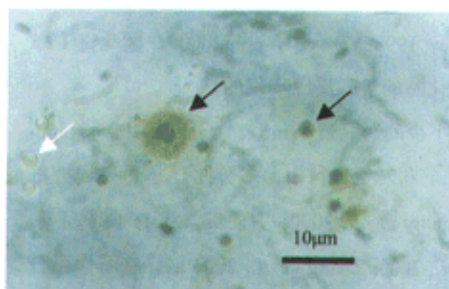


图 9-1 菜粉蝶蛹血细胞酚氧化酶染色结果
染色后的血细胞 (黑箭头所示) 和未染色的血细胞 (白箭头所示)。

Fig. 9-1 Phenoloxidase stained results of hemocytes
Stained hemocytes (black arrow) and non-stained hemocytes (white arrow).

1.5 血淋巴黑化作用的测定

分别取寄生或注射毒液后 0.5, 1, 2, 3, 4 d 含血细胞和不含血细胞的菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴 30 μ l, 加到含 70 μ l TC 100 昆虫细胞培养基的 96 孔细胞培养板中, 并加入 30 粒左右 Sephadex A-50 珠, 室温培养 2 h 后, 于 Leica 显微镜下计数黑化和未黑化 Sephadex A-50 珠, 每处理重复 3 次。并以同期未寄生或注射 TBS 菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴作对照。

1.6 菜粉蝶蛹血淋巴离体黑化作用

含血细胞和不含血细胞寄生前后的血淋巴 30 μ l 加至含 70 μ l TBS 的细胞培养板中, 并在孔中分别加入毒液 2 μ l (含 5 VRE)、1 mM 苯基硫脲 (PTU) 5 μ l, 以加 5 μ l TBS 孔作对照, 室温置 2 h, 观察各孔中血淋巴黑化作用, 并拍照。同样处理另一组孔中加入约 30 个左右的 Sephadex A-50 珠, 每处理重复 3 次, 室温置 2 h 后, 观察孔中 Sephadex A-50 珠的黑化情况。

2 结果

2.1 血细胞酶氧化酶活性

酚氧化酶染色和未染色的血细胞如图 9-1 所示。寄生 ($F = 0.11$, $P = 0.75$) 和注射毒液 ($F = 0.06$, $P = 0.82$) 对菜粉蝶蛹血细胞中酶氧化酶活性无显著影响。寄生 ($F = 0.42$, $P = 0.54$) 和注射毒液 ($F = 0.002$, $P = 0.97$) 对柑桔凤蝶蛹血细胞中酶氧化酶活性也无显著影响。

日龄对菜粉蝶未寄生蛹 ($F = 20.41$, $P = 0.001$)、寄生蛹 ($F = 7.78$, $P = 0.004$) 和注射 TBS

蛹 ($F = 3.51, P = 0.05$) 血细胞酚氧化酶活性均有显著影响, 随菜粉蝶蛹日龄的增加, 血细胞中酚氧化酶活性逐渐减弱, 而日龄对注射毒液蛹 ($F = 3.35, P = 0.06$) 血细胞酚氧化酶活性无显著影响。日龄对柑桔凤蝶未寄生蛹 ($F = 5.87, P = 0.01$)、寄生蛹 ($F = 5.34, P = 0.02$)、注射 TBS 蛹 ($F = 7.41, P = 0.005$) 及注射毒液蛹 ($F = 4.77, P = 0.02$) 血细胞酚氧化酶活性均有显著影响, 随柑桔凤蝶蛹日龄的增长, 血细胞中酚氧化酶活性逐渐减弱 (图 9-2)。

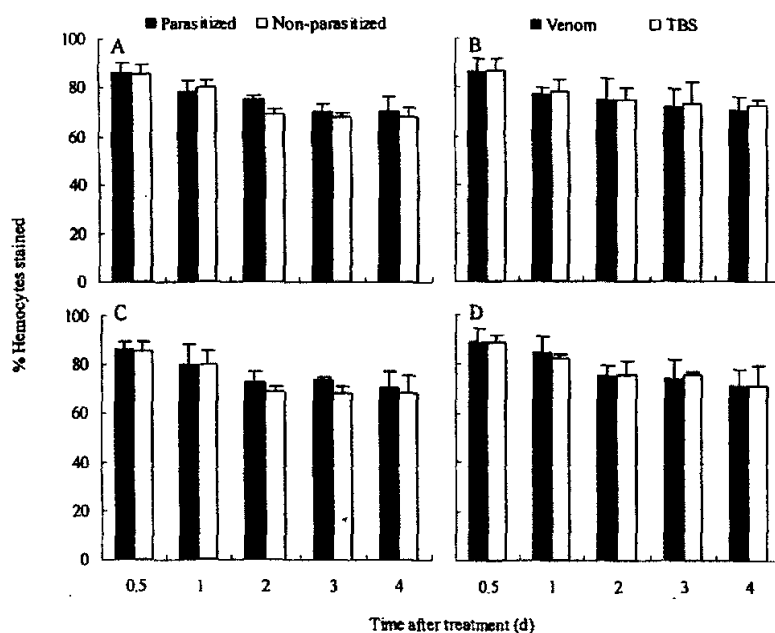


图 9-2 寄生和注射毒液对菜粉蝶 (A 和 C) 和柑桔凤蝶 (B 和 D) 蛹血细胞酚氧化酶活性的影响

Fig. 9-2 Effects of parasitization and venom injection on phenoloxidase activity of hemocytes from *Pieris rapae* (A and C) and *Papilio xuthus* (B and D) pupae

2.2 血淋巴黑化作用

黑化和未黑化的 Sephadex A-50 珠的形态如图 9-3 所示。菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生或注射毒液后, 血淋巴对 Sephadex A-50 黑化作用均未受到抑制, 血细胞对血淋巴的黑化能力也无显著影响 (表 9-1 和表 9-2)。

2.3 血淋巴离体黑化作用

蝶蛹金小蜂毒液对寄生前后含血细胞和不含血细胞的菜粉蝶蛹血淋巴离体黑化作用均无抑制作用, 而苯基硫脲 (PTU) 则可完全抑制菜粉蝶蛹血淋巴的离体黑化 (图 9-5)。蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹含血细胞和不含细胞的血淋巴对 Sephadex A-50 的离体黑化作用无任何影响, 而 PTU 则可完全抑制菜粉蝶和柑桔凤蝶血淋巴对 Sephadex A-50 珠的黑化 (图 9-5)。

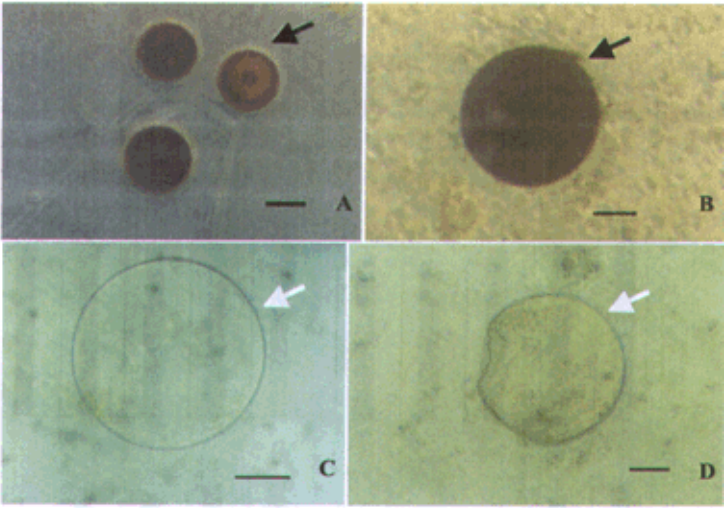


图 9-3 蝶蛹金小蜂毒液 (A 和 B) 和 PTU (C、D) 处理后血淋巴对 Sephadex A-50 珠黑化情况

Fig. 9-3 Effects of *Pteromalus puparum* venom (A and B) and PTU (C and D) on the melanization capability of hemolymph to Sephadex A-50 beads

A 和 C: 不含血细胞的血淋巴; B 和 D: 含血细胞的血淋巴。A, C: Hemolymph with hemocytes; B, D: Hemolymph with out hemocytes.

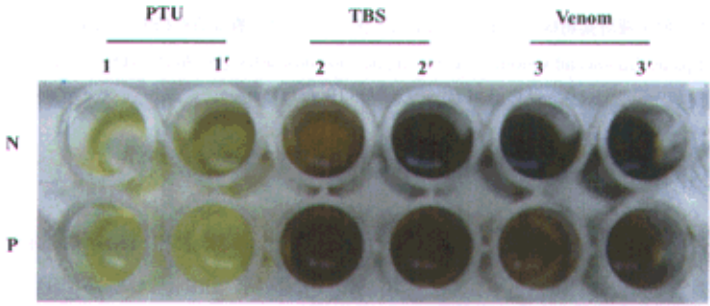


图 9-4 蝶蛹金小蜂毒液和苯基硫脲对菜粉蝶蛹血淋巴离体黑化作用的影响

Fig. 9-4 Effects of *Pteromalus puparum* venom and PTU on melanization of hemolymph from *Pieris rapae* pupae *in vitro*

PTU: PTU 处理; TBS: TBS 处理, 为对照; Venom: 毒液处理; N: 未寄生蛹血淋巴; P: 寄生蛹血淋巴; 1, 2, 3: 含血细胞血淋巴; 1', 2', 3': 不含血细胞血淋巴。PTU: Treated with PTU; TBS: Treated with TBS; Venom: Treated with *Pteromalus puparum* venom; N: hemolymph of non-parasitized pupae; P: hemolymph of parasitized pupae; 1, 2, 3: Hemolymph with hemocytes; 1', 2', 3': Hemocytes free hemolymph.

表 9-1 菜粉蝶蛹被寄生或注射毒液后血淋巴对 Sephadex A-50 珠的黑化率
Table 9-1 Melanization capability of hemolymph from *Pieris rapae* pupae to Sephadex A-50 after parasitization or venom injection

Treatment	Hemolymph	Time after treatment (d)				Age effect	Hemocyte effect	Parasitization/ Venom effect
		0.5	1	2	3	4		
Parasitized	With hemocytes	100	100	98.96 ± 1.80	99.02 ± 1.70	99.10 ± 1.56	$F = 0.50$, $P = 0.74$	$F = 0.70$,
	Without hemocytes	98.89 ± 1.92	98.81 ± 2.06	99.07 ± 1.60	98.95 ± 1.75	99.17 ± 1.44	$F = 0.005$, $P = 1.00$	$P = 0.41$
Non-parasitized	With hemocytes	99.02 ± 1.70	99.07 ± 1.60	98.95 ± 1.79	99.07 ± 1.60	100	$F = 0.25$, $P = 0.90$	$F = 0.000$, $P = 0.998$
	Without hemocytes	98.85 ± 1.99	100	98.92 ± 1.86	99.17 ± 1.44	98.92 ± 1.86	$F = 0.36$, $P = 0.70$	$F = 0.003$, $P = 0.96$
Injected with venom	With hemocytes	100	100	100	98.96 ± 1.80	98.85 ± 1.95	$F = 0.50$, $P = 0.74$	$F = 0.41$,
	Without hemocytes	99.05 ± 1.65	98.99 ± 1.75	98.89 ± 1.92	99.15 ± 1.48	99.22 ± 1.34	$F = 0.005$, $P = 1.00$	$P = 0.53$
Injected with TBS	With hemocytes	99.07 ± 1.60	99.07 ± 1.60	99.22 ± 1.34	99.10 ± 1.56	100	$F = 0.25$, $P = 0.90$	$F = 0.020$, $P = 0.888$
	Without hemocytes	99.17 ± 1.44	100	99.12 ± 1.52	99.05 ± 1.65	98.96 ± 1.80	$F = 0.002$, $P = 0.97$	$P = 0.97$

表 9-2 柑桔凤蝶蛹被寄生或注射毒液后血淋巴对 Sephadex A-50 珠的黑化率
Table 9-2 Melanization capability of hemolymph from *Papilio xuthus* pupae to Sephadex A-50 after parasitization or venom injection

Treatment	Hemolymph	Time after treatment (d)				Age effect	Hemocyte effect	Parasitization/ Venom effect
		0.5	1	2	3	4		
Parasitized	With hemocytes	99.15 ± 1.48	98.96 ± 1.80	99.15 ± 1.48	99.15 ± 1.48	98.95 ± 1.75	$F = 0.25$, $P = 0.90$	$F = 2.28$, $P = 0.14$
	Without hemocytes	100	100	100	99.15 ± 1.48	100	$F = 1.00$, $P = 0.40$	
Non-parasitized	With hemocytes	100	99.10 ± 1.56	98.96 ± 1.80	99.15 ± 1.48	100	$F = 0.50$, $P = 0.74$	$F = 0.383$, $P = 0.539$
	Without hemocytes	99.07 ± 1.60	99.07 ± 1.60	99.17 ± 1.44	100	98.96 ± 1.80	$F = 0.22$, $P = 0.64$	
Injected with venom	With hemocytes	99.10 ± 1.56	99.21 ± 1.37	100	99.05 ± 1.65	100	$F = 0.25$, $P = 0.90$	$F = 2.03$, $P = 0.17$
	Without hemocytes	100	100	100	99.02 ± 1.70	100	$F = 1.00$, $P = 0.45$	
Injected with TBS	With hemocytes	100	99.05 ± 1.65	99.12 ± 1.52	99.21 ± 1.37	99.05 ± 1.65	$F = 0.50$, $P = 0.74$	$F = 0.429$, $P = 0.515$
	Without hemocytes	99.05 ± 1.65	99.17 ± 1.44	99.15 ± 1.48	100	98.81 ± 2.06	$F = 0.23$, $P = 0.64$	

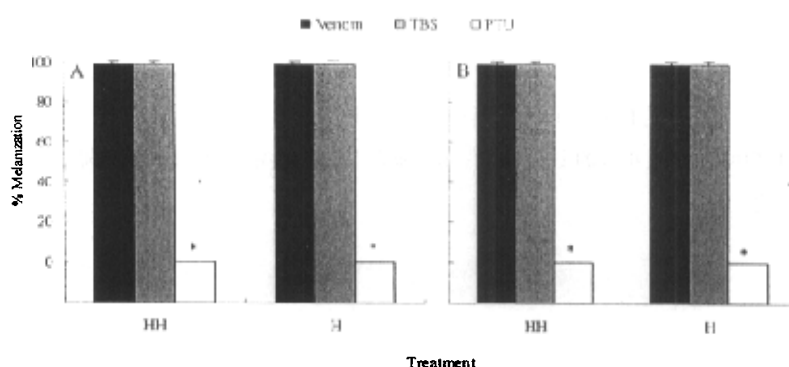


图 9-5 蝶蛹金小蜂毒液和苯基硫脲对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴离体黑化作用的影响

Fig. 9-5 Effects of *Pteromalus puparum* venom and PTU on melanization capability of hemolymph from *Pieris rapae* and *Papilio xuthus* pupae to Sephadex A-50 beads *in vitro*

A: 菜粉蝶蛹血淋巴; B: 柑桔凤蝶蛹血淋巴; HH: 含血细胞的血淋巴; H: 不含血细胞的血淋巴; Venom、TBS 和 PTU: 分别以蝶蛹金小蜂毒液、TBS 和 PTU 处理。A: *Pieris rapae* pupae; B: *Papilio xuthus* pupae; HH: Hemolymph with hemocytes; H: Hemolymph without hemocytes; Venom, TBS, PTU: Treated with venom, TBS and PTU, respectively.

3 讨论

一般说来, 寄生蜂的多分DNA病毒是抑制其寄主血淋巴的酚氧化活性及其黑化作用 (Beckage *et al.*, 1990; Shelby *et al.*, 2000; 尹丽红, 2001) 的主要因子。Shelby等 (2000) 进一步研究表明, 这种抑制作用与酚氧化酶基因在翻译水平上受到多分DNA病毒的抑制有关。寄生蜂毒液也有抑制其寄主血淋巴酚氧活性的作用, 如Asgari等 (2003) 在菜粉蝶微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula* 毒液中分离到抑制菜粉蝶幼虫血淋巴黑化的 50 kDa 蛋白, 此蛋白与丝氨酸蛋白酶类似物 (serine proteinase homologs, SPHs) 有相似的序列及结构域 (Kwon *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003)。而蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对其寄主菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹血淋巴黑化作用均无任何影响 (表9-1和9-2; 图9-4和9-5), 说明蝶蛹金小蜂可能是通过非主动抑制克服寄主的体液免疫, 而可能以卵表物质通过“分子拟态”逃避了寄主血淋巴中酚氧化酶的识别因子。同时寄主血淋巴中的血细胞对血淋巴的黑化作用也无显著影响 (表9-1和9-2), 说明血细胞对血浆的黑化作用不是必需的, 昆虫血浆中存在异物的识别因子, 识别到异物后激活寄主的原酚氧化酶的级联系统, 从而使异物黑化。细胞也可通过自身的识别因子识别到入侵异物, 而产生吞噬、包裹或形成结节等细胞免疫反应, 且以上过程, 尤其是包裹形成过程中往往伴有黑化过程, 血细胞和血淋巴中的识别因子是否相同, 二者的关系如何? 细胞免疫和体液免疫的关系到底如何? 这都是值得探讨的问题。

蝶蛹金小蜂毒液虽然能抑制其血细胞的延展、存活及包裹作用, 但对其寄主血细胞中酚

氧化酶活性无显著影响,昆虫血细胞中酚氧化酶在其免疫反应中起何种作用?也需做进一步研究。

总之,蝶蛹金小蜂毒液可抑制其寄主血细胞的免疫反应(见第二、七和八章),而对寄主和体液免疫则无任何抑制作用,综合前期研究结果,我们认为蝶蛹金小蜂通过卵表物质逃避寄主体液免疫,通过毒液的主动抑制作用克服寄主的细胞免疫,从而使蜂卵得以在寄主体内成功发育。

第十章 毒液对菜粉蝶非免疫系统组织细胞的影响

寄生蜂毒液单独或与其它因子协同可作用于寄主的免疫系统 (Richards & Edwards, 1999 b; Richards & Edwards, 2000a, b; Richards & Parkinson, 2000 a; Richards & Edward, 2000 a, b; Shelby *et al.*, 2000; Parkinson *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2002; Asgari *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a)、神经系统 (Bocchino & Sullivan, 1981; Visser *et al.*, 1983; Klein & Becakge, 1990; Parkinson & Weaver, 1999; Libesert, 2003)、生殖系统 (Tanaka, *et al.*, 1994; Jones, 1996; Reed & Beckage, 1997; Tagashira & Tanaka, 1998; Digilio *et al.*, 2000)、内分泌系统 (Beckage, 1985; Tanaka *et al.*, 1987; Tanaka & Vinson, 1991; Pennacchio *et al.*, 1997, 1998; Kelly *et al.*, 1998)、肌肉系统 (Beard, 1952) 和脂肪体 (Nakamatsu & Tanaka, 2003 a, 2004) 等组织器官。以上研究均是针对某一种组织器官进行的研究, 而寄生蜂对其寄主昆虫非免疫系统其它组织器官细胞影响的研究还尚未有人尝试, 故我们做了此项研究。并在细胞水平上确定蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑、咽下神经节、睾丸、成虫卵巢、中肠、脂肪体及幼虫丝腺细胞的行为及存活的影响, 在确定寄生蜂毒液对寄主和非寄主昆虫的非免疫系统作用的潜在靶标, 进一步揭示寄生蜂毒液的生理功能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂和丽蝇集金小蜂及菜粉蝶蛹的来源及饲养方法见第二章和第五章。

1.2 菜粉蝶蛹不同组织细胞的分离、培养与观察

分别解剖菜粉蝶蛹的脑、咽下神经节、睾丸、卵巢 (成虫)、丝腺 (幼虫)、中肠及脂肪体, 以去离子水清洗 3 次后, 以剪刀轻轻将其碾碎, 放入小三角瓶中, 加入 30~50 倍组织量的 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.1% 链霉素)。37℃ 消化, 并每隔 5 min 轻摇 1 次, 1 h 后拿出轻摇, 待大部分组织残体沉降后, 以吸管吸出上清。取 500 μ l 加到细胞培养皿 (Corning®, US) 中, 并加入 1 ml TC 100 昆虫细胞培养基, 加入毒液, 并调节其浓度为 0.01 VRE/ μ l, 以加入 TBS 缓冲液的培养皿设为对照。28℃ 于细胞培养箱内培养 0.5 和 4 h 后, 以 Leica 倒置显微镜观察细胞贴壁情况, 并取出 100 μ l 与等体积 0.04% 台盼蓝溶液混匀, 室温置 10 min 后于 Leica 倒置显微镜下考查染成蓝色 (死亡) 和未着色 (存活) 的细胞的数量, 计算细胞死亡率。

2 结果

蝶蛹金小蜂和丽蝇集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹神经系统的脑、咽下神经节, 生殖系统的睾丸、成虫卵巢、消化系统的中肠及脂肪体和幼虫丝腺细胞的存活均无任何影响, 处理后

0.5 和 4 h 所有细胞的死亡率均为 0 (表 9-1)。蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑 ($F = 199.44$, $P < 10^{-4}$)、咽下神经节 ($F = 185.93$, $P < 10^{-4}$)、中肠 ($F = 129.22$, $P < 10^{-4}$) 及脂肪体 ($F = 956.36$, $P < 10^{-4}$) 细胞的贴壁行为有显著影响, 蝶蛹金小蜂毒液存在情况下, 四种细胞的贴壁行为均受到严重抑制, 而成虫卵巢 ($F = 0.006$, $P = 0.94$)、睾丸 ($F = 0.35$, $P = 0.57$) 及幼虫丝腺细胞 ($F = 0.21$, $P = 0.66$) 的贴壁行为均未受影响。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑 ($F = 0.01$, $P = 0.91$)、咽下神经节 ($F = 1.31$, $P = 0.28$)、睾丸 ($F = 0.001$, $P = 0.98$)、成虫卵巢 ($F = 0.03$, $P = 0.88$)、幼虫丝腺 ($F = 0.10$, $P = 0.76$)、中肠 ($F = 0.004$, $P = 0.95$) 及脂肪体 ($F = 0.06$, $P = 0.81$) 细胞的存活和贴壁行为均无显著影响。

3 讨论

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹神经系统的脑、咽下神经节, 生殖系统的睾丸、成虫卵巢、消化系统的中肠及脂肪体和幼虫的丝腺细胞存活均无任何影响, 反映在组织水平上则是毒液对菜粉蝶蛹的神经系统、消化系统、生殖系统及脂肪体功能无直接影响。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑、咽下神经节、睾丸、成虫卵巢, 中肠、脂肪体和幼虫丝腺细胞的贴壁存活均无任何影响, 说明以上组织均非丽蝇蛹集金小蜂的作用靶标。而蝶蛹金小蜂毒液对非寄主昆虫来源的 Tn 细胞系和 Ha 细胞系的存活均有显著影响、丽蝇蛹集金小蜂毒液对 Ha 细胞系的存活也有显著影响 (见第五章), 而对菜粉蝶的非免疫组织细胞的存活均显著影响, 其原因尚待进一步研究。已有研究表明, 丽蝇蛹集金小蜂毒液对双翅目昆虫胚胎来源的 NIH-SaPe4 和 CRL-1963 细胞系、鳞翅目昆虫卵巢来源的 TN-368 和 sf21、胚胎来源的 BT1-TN5B1-4 和脂肪体来源的 IPL-Ldfbe1 及来源于脊椎动物的 ICR-2A 细胞系的存活均有显著影响 (Rivers *et al.*, 1999)。Parkinson & Weaver (1999) 也在瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液中已经分离到对 sf21 细胞系有毒性的小于 13 kDa 的蛋白。以上细胞系均是来源于昆虫的非免疫系统, 甚至来源于更高等动物, 寄生蜂毒液对细胞系的存活有显著影响, 能否说明以上细胞系来源的组织是某种寄生蜂毒液的潜在靶标器官? 寄生蜂毒液对昆虫细胞系及其来源的组织器官的作用究竟有何不同? 寄生蜂毒液诱导细胞系死亡的机理何在? 都是值得深入探讨的问题。

表 10-1 两种金小蜂毒液对菜粉蝶蛹非免疫系统组织细胞的贴壁和死亡率的影响

Table 10-1 Effects of two pteromalid wasp venoms on adhering ratio and mortality of cells from non-immunity system tissue

	Venom	Treatment time	Brain	Subpharyngeal ganglion	Testicle	Ovary	Silk-gland	Mid-gut	Fat body
Adhering ratio	Pp-venom	0.5 h	5.71 ± 5.15	5.59 ± 4.90	90.30 ± 0.52	95.14 ± 4.34	94.89 ± 4.65	6.36 ± 5.53	0
		4 h	6.73 ± 5.92	6.73 ± 5.92	97.22 ± 4.81	97.22 ± 4.82	96.97 ± 5.25	6.73 ± 5.92	0
	Nv-venom	0.5 h	97.44 ± 4.44	94.19 ± 5.04	94.19 ± 5.04	95.35 ± 4.09	95.96 ± 3.51	93.45 ± 1.21	97.22 ± 4.81
		4 h	98.14 ± 3.21	96.97 ± 5.25	97.22 ± 4.81	97.78 ± 3.85	97.44 ± 4.44	95.21 ± 4.18	97.44 ± 4.44
	Control	0.5 h	94.59 ± 4.79	91.63 ± 0.70	94.10 ± 5.24	94.19 ± 5.04	96.67 ± 5.77	90.74 ± 8.49	98.15 ± 3.21
		4 h	100	94.19 ± 5.04	96.97 ± 5.25	97.44 ± 4.44	97.22 ± 4.81	94.41 ± 4.90	98.41 ± 2.75
Mortality	Pp-venom	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0
		4 h	0	0	0	0	0	0	0
	Nv-venom	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0
		4 h	0	0	0	0	0	0	0
	Control	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0
		4 h	0	0	0	0	0	0	0

第十一章 毒液对蝶蛹金小蜂非寄主昆虫血细胞及昆虫细胞系的影响

在长期协同进化过程中,通过寄生蜂和寄主的相互选择,寄生蜂形成其特定的寄主范围。寄生蜂毒液也有其特定的作用范围,但寄生蜂毒液的作用范围一般大于其寄主范围(Coudron & Puttler, 1988; Rivers *et al.*, 1993)。寄生蜂毒液可抑制其寄主血细胞的延展,并诱导血细胞的死亡(Richard & Edwards, 1999 a; Richard & Parkinson, 2000 b; Rivers *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2004)。已经有人研究了寄生蜂毒液对其非寄主昆虫的发育或存活的影响(Coudron & Puttler, 1988; Coudron *et al.*, 1993; Rivers *et al.*, 1993)。然而,寄生蜂寄生蜂毒液对其非寄主昆虫血细胞延展和存活的影响尚未见报道,对两种寄生蜂毒液作用范围进行比较的研究更未有人涉足,故我们做了此方面的研究。试验中,选取内寄生性蝶蛹金小蜂为研究对象,考察其毒液对 10 目 17 种非寄主昆虫的血细胞及 2 种昆虫细胞系形态的影响,并与另一种外寄生的丽蝇蛹集金小蜂毒液作对比,一方面明确寄生蜂毒液对其非寄主昆虫血细胞延展和存活的影响,另一方面也对内寄生和外寄生蜂毒液的作用范围作一对比,同时也为确定寄生蜂毒液活性因子适用的昆虫靶标建立一种快速评价方法。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金蜂的来源及饲养方法见第二章和第三章,昆虫细胞系的来源及培养方法见第五章。供试昆虫包括以下 17 种:中华稻蝗成虫 *Oxya chinensis*、美洲大蠊成虫 *Periplaneta americana*、瘤缘蝽若虫 *Acanthocoris scaber*、假眼小绿叶蝉若虫 *Empoasca vitis*、小菜蛾幼虫 *Plutella xylostella*、大蜡螟幼虫 *Galleria mellonella*、大螟幼虫 *Sesamia inferens*、棉铃虫幼虫 *Helicoverpa armigera*、斜纹夜蛾幼虫 *Spodoptera litura*、家蚕幼虫 *Bombyx mori*、直纹稻苞虫幼虫 *Parnara guttatus*、大猿叶虫幼虫 *Colaphellus bowringi*、中华蜜蜂幼虫 *Apis cerana*、黑翅土白蚁成虫 *Odontotermes formosanus*、茶尺蠖幼虫 *Ectropis obliqua*、家蝇 *Musca domestica* 和棕尾别麻蝇幼虫 *Sarcophaga peregrina*。

1.2 毒液的提取

寄生蜂毒液提取方法见第二章。

1.3 昆虫血细胞的离体培养

所有昆虫收集血淋巴前均需体表消毒。收集的血淋巴分别置于含少量苯基硫脲的 Eppendorf 离心管中, 各取 50 μl 分别加到每孔含 198 μl 的 TC 100 昆虫细胞培养液 (含 10% 胎牛血清) 的 48 孔细胞培养板的各孔穴中。尔后, 将不同浓度的毒液提取液按 2 μl 的量分别加入 3 个不同孔穴中, 使有关孔穴中毒液剂量分别调至为 0.002、0.004、0.008、0.016 和 0.02 VRE/ μl 。设仅加 2 μl TBS 缓冲液为对照。接着, 置 27℃ 细胞培养箱中培养, 并分别于 0.5 和 4 h 后, 置 Leica 倒置显微镜下任选 3 个视野观察、考查各处理孔穴中延展和未延展血细胞的数量, 并计算血细胞的延展率和延展抑制率。以台盼蓝染色的方法确定细胞死亡率。

1.4 昆虫细胞系的培养

在 96 孔细胞培养板孔中接入细胞, 以 TC 100 昆虫细胞培养液, 调节体积至 99 μl , 27℃ 于细胞培养箱内生长 24 h, 挑选生长良好的孔内加入 1 μl 毒液, 并使孔内毒液浓度分别为 0.0005, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.05 VRE/ μl , 以加 1 μl TBS 的孔作对照, 每毒液浓度处理 3 孔, 分别于培养后 0.5 和 4 h 于显微镜下参照方法 1.3 统计 Tn 细胞的延展、未延展、存活和死亡的数量及 Ha 细胞死亡的数量。

2 结果

2.1 非寄主昆虫血细胞延展

2.1.1 斜纹夜蛾幼虫血细胞

蝶蛹金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞 ($F=24.40, P<10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F=23.90, P<10^{-4}$) 的延展有显著抑制作用, 这种作用受到毒液浓度的显著影响 ($F=241.23, P<10^{-4}$; $F=182.56, P<10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F=0.0001, P=0.98$; $F=0.05, P=0.83$) (图 11-1 A 和 B; 图 11-2)。然而, 丽蝇蛹集金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞 ($F=2.70, P=0.11$) 和颗粒血细胞 ($F=0.04, P=0.84$) 延展无显著影响 (图 11-2)。由血细胞种类的延展看来, 斜纹夜蛾幼虫颗粒血细胞比浆血细胞对蝶蛹金小蜂毒液更敏感 (表 11-1 和 11-2)。

蝶蛹金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞 ($F=69.23, P<10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F=75.83, P<10^{-4}$) 的存活也有显著抑制作用, 这种作用受到毒液浓度的显著影响 ($F=160.13, P<10^{-4}$; $F=52.98, P<10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F=0.13, P=0.72$; $F=0.33, P=0.57$)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞和颗粒血细胞的存活则无显著影响 (表 11-3)。

2.1.2 家蝇和棕尾别麻蝇

蝶蛹金小蜂毒液对家蝇浆血细胞 ($F = 40.92, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 20.95, P = 0.0001$) 的延展有显著抑制作用, 这种作用受毒液浓度的显著影响 ($F = 297.63, P < 10^{-4}$; $F = 308.18, P < 10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F = 0.07, P = 0.79$; $F = 0.04, P = 0.85$)。丽蝇蛹集金小蜂对家蝇浆血细胞 ($F = 48.46, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 16.97, P = 0.0002$) 的延展也有显著抑制作用, 这种作用受毒液浓度的显著影响 ($F = 586.55, P < 10^{-4}$; $F = 484.50, P < 10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F = 0.002, P = 0.97$; $F = 0.005, P = 0.94$) (图 11-3 和 11-4)。由不同血细胞的延展率看来, 家蝇浆血细胞比颗粒血细胞对两种金小蜂毒液更敏感 (表 11-1 和 11-2)。由毒液种类看来, 蝶蛹金小蜂毒液对家蝇两种血细胞延展的抑制能力要强于丽蝇蛹集金小蜂毒液 (表 11-1 和 11-2)。

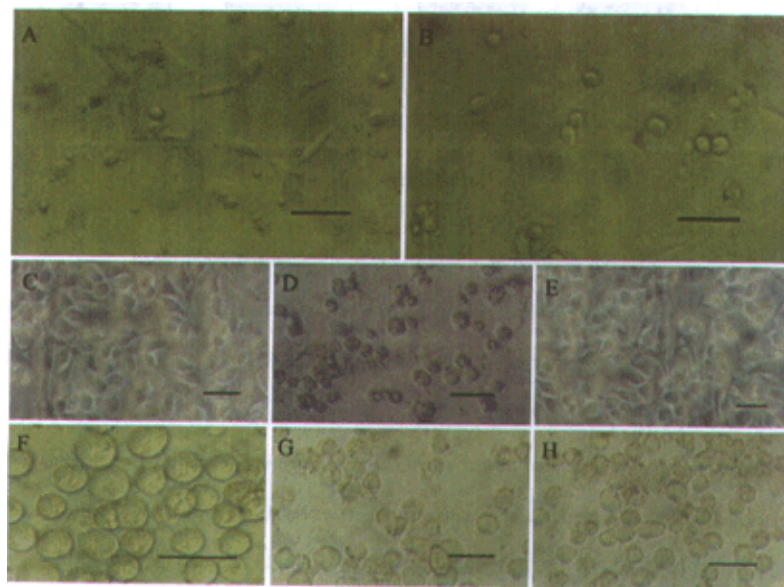


图 11-1 两种细胞系和斜纹夜蛾幼虫血细胞延展显微图

Fig. 11-1 Micrographs of *Spodoptera litura* larvae hemocytes and two insect cell lines

A, C, F: 正常的斜纹夜蛾幼虫血细胞、Tn 细胞和 Ha 细胞; B, D, G: 蝶蛹金小蜂毒液处理后的斜纹夜蛾幼虫血细胞、Tn 细胞和 Ha 细胞; E, H: 丽蝇蛹集金小蜂毒液处理后的 Tn 细胞和 Ha 细胞。标尺代表 10 μm 。 A, C, F: *Spodoptera litura* larvae hemocytes and two cell lines in normal condition; B, D, G: *Spodoptera litura* larvae hemocytes and two cell lines after treated with *Pteromalus puparum* venom; E, H: Tn cells and Ha cells after treated with *Nasonia vitripennis* venom. Scale bar = 10 μm .

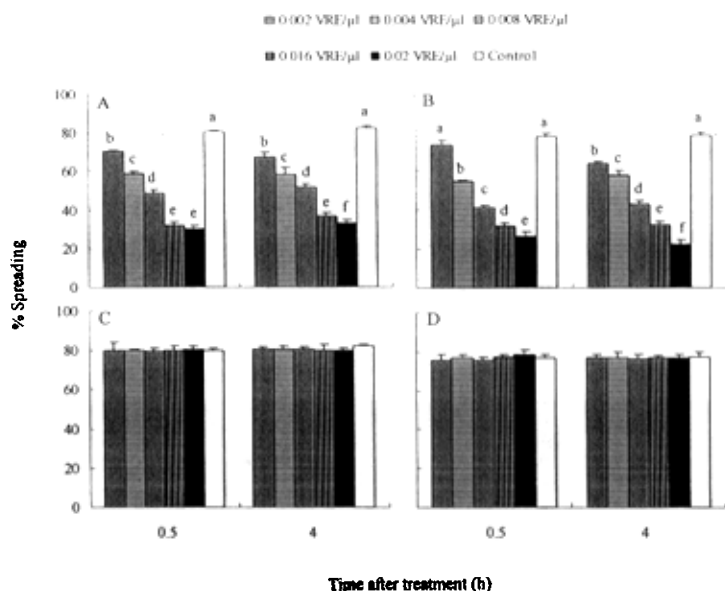


图 11-2 两种金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫血细胞延展的影响

Fig. 11-2 Effects of venoms from two species of pteromalid wasps on spreading of *Spodoptera litura* hemocytes
A, B: 蝶蛹金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞和颗粒血细胞延展的影响; C, D: 丽蝇蛹集金小蜂毒液对斜纹夜蛾幼虫浆血细胞和颗粒血细胞延展的影响。A, B: Spreading percent of plamatoocytes and granular cells from *Spodoptera litura* larvae after treated with *Pteromalus puparum* venom; C, D: Spreading percent of plamatoocytes and granular cells from *Spodoptera litura* larvae after treated with *Nasonia vitripennis* venom.

蝶蛹金小蜂毒液对棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞 ($F = 34.35, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 18.37, P = 0.0001$) 的延展有显著抑制作用, 这种作用受毒液浓度的显著影响 ($F = 783.56, P < 10^{-4}; F = 300.39, P < 10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F = 0.05, P = 0.83; F = 0.02, P = 0.90$) (图 11-5)。丽蝇蛹集金小蜂毒液对棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞 ($F = 47.43, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 15.89, P = 0.0003$) 的延展也有显著抑制作用, 这种作用同样受毒液浓度的显著影响 ($F = 987.69, P < 10^{-4}; F = 422.08, P < 10^{-4}$), 而不受处理后时间的影响 ($F = 0.01, P = 0.92; F = 0.04, P = 0.85$) (图 11-3 和 11-4)。由不同血细胞的延展率看来, 棕尾别麻蝇浆血细胞比颗粒血细胞对两种金小蜂毒液更敏感 (表 11-1 和 11-2)。由毒液种类看来, 蝶蛹金小蜂毒液对棕尾别麻蝇两种血细胞延展的抑制能力比丽蝇蛹集金小蜂毒液强 (表 11-1 和 11-2)。

表 11-1 两种金小蜂对斜纹夜蛾、家蝇和棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞抑制延展中量

Table 11-1 Response of plasmatocytes from three kinds of insects to the venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* after treatment for 0.5 and 4 hours

Insect	Venom	0.5 h			4 h		
		IC ₅₀ (10 ⁻² VRE/μl)	Slope ± SE	P	IC ₅₀ (10 ⁻² VRE/μl)	Slope ± SE	P
<i>Spodoptera</i>		1.07			1.00		
<i>litura</i>	Pp	(0.68, 2.15)	1.60 ± 0.36	< 10 ⁻⁴	(0.67, 1.80)	1.46 ± 0.31	< 10 ⁻⁴
larvae	Nv	> 2	-	-	> 2	-	-
<i>Musca</i>		0.89			0.69		
<i>domestica</i>	Pp	(0.31, 1.88)	1.35 ± 0.28	< 10 ⁻⁴	(0.35, 1.19)	1.23 ± 0.21	< 10 ⁻⁴
larvae	Nv	0.66 (0.15, 1.77)	1.33 ± 0.31	< 10 ⁻⁴	0.57 (0.18, 1.26)	1.23 ± 0.26	< 10 ⁻⁴
<i>Sarcophaga</i>		0.64			0.59		
<i>peregina</i>	Pp	(0.45, 1.10)	1.53 ± 0.32	< 10 ⁻⁴	(0.41, 0.97)	1.52 ± 0.32	< 10 ⁻⁴
larvae	Nv	0.54 (0.35, 1.17)	1.33 ± 0.35	< 10 ⁻⁴	0.47 (0.33, 0.82)	1.38 ± 0.32	< 10 ⁻⁴

表 11-2 两种金小蜂对斜纹夜蛾、家蝇和棕尾别麻蝇幼虫颗粒血细胞抑制延展中量

Table 11-2 Spreading percentage of granular cells from three kinds of insects after treated with venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* for 0.5 and 4 hours.

Insect	Venom	0.5 h			4 h		
		IC ₅₀ (10 ⁻² VRE/μl)	Slope ± SE	P	IC ₅₀ (10 ⁻² VRE/μl)	Slope ± SE	P
<i>Spodoptera litura</i>	Pp	0.57 (0.39, 0.77)	1.18 ± 0.22	<10 ⁻⁴	0.50 (0.31, 0.70)	1.04 ± 0.21	<10 ⁻⁴
	larvac	Nv	> 2	-	> 2	-	-
<i>Musca domestica</i>	Pp	1.58 (0.86, 2.54)	1.45 ± 0.27	<10 ⁻⁴	1.39 (0.65, 2.46)	1.47 ± 0.29	<10 ⁻⁴
	larvae	Nv	2.18 (1.03, 3.76)	1.49 ± 0.33	<10 ⁻⁴	1.82 (0.94, 3.01)	1.54 ± 0.31
<i>Sarcophaga peregina</i>	Pp	1.21 (0.84, 1.99)	1.77 ± 0.34	<10 ⁻⁴	0.98 (0.72, 1.46)	1.71 ± 0.30	<10 ⁻⁴
	larvae	Nv	1.39 (0.89, 2.63)	1.77 ± 0.38	<10 ⁻⁴	1.17 (0.82, 1.89)	1.82 ± 0.34

表 11-3 两种金小蜂对斜纹夜蛾、家蝇和棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞血细胞死亡率的影响

Table 11-3 Mortality of plasmatocytes and granular cells from three kinds of insects after treated with venoms from *Pteromatus puparum* and *Nasonia vitripennis* for 0.5 and 4 hours.

Insect	Cell type	0.5 h			4 h		
		Pp-venom	Nv-venom	Control	Pp-venom	Nv-venom	Control
<i>Spodoptera litura</i> larvae	PLs	35.0 ± 1.0 b	7.5 ± 0.7 a	6.1 ± 1.8 a	36.4 ± 0.9 b	8.9 ± 1.3 a	5.7 ± 1.0 a
	GRs	34.6 ± 1.1 b	7.0 ± 0.3 a	4.9 ± 4.3 a	38.7 ± 1.1 b	7.4 ± 0.6 a	4.0 ± 3.5 a
<i>Musca domestica</i> larvae	PLs	40.2 ± 0.9 b	44.3 ± 1.9 b	2.9 ± 1.1 a	41.6 ± 1.7 b	43.3 ± 1.5 b	5.2 ± 1.3 a
	GRs	39.2 ± 1.9 b	44.0 ± 0.4 b	3.0 ± 5.2 a	44.2 ± 0.7 b	46.6 ± 1.4 b	5.4 ± 4.8 a
<i>Sarcophaga peregrina</i> larvae	PLs	35.0 ± 1.0 b	36.1 ± 1.1 b	3.4 ± 1.6 a	35.6 ± 1.7 b	37.4 ± 1.2 b	4.6 ± 1.0 a
	GRs	34.8 ± 1.5 b	36.1 ± 1.4 b	3.9 ± 3.4 a	38.0 ± 0.9 b	39.7 ± 0.9 b	7.3 ± 2.4 a

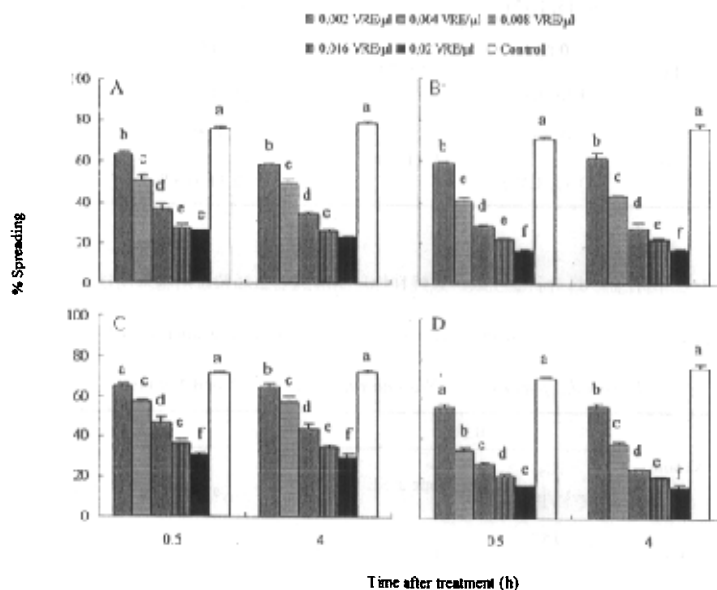


图 11-3 蝶蛹金小蜂毒液对家蝇和棕尾别麻蝇幼虫血细胞延展的影响

Fig. 11-3 Effects of venom from *Pteromatus puparum* with various concentrations on the spreading of hemocytes from *Musca domestica* and *Sarcophaga peregrina* larvae

A: 家蝇幼虫浆血细胞; B: 家蝇幼虫颗粒血细胞; C: 棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞; D: 棕尾别麻蝇颗粒血细胞。A, B: Plasmatocytes and granular cells from *Musca domestica* larvae; C, D: Plasmatocytes and granular cells from *Sarcophaga peregrina* larvae.

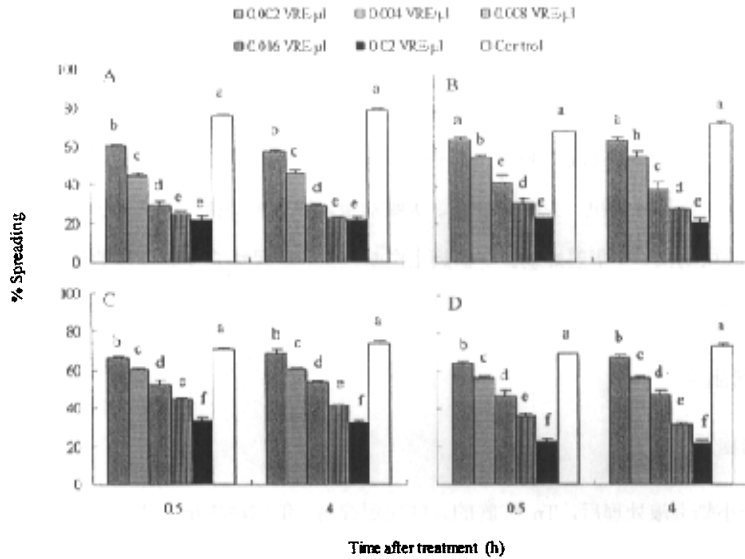


图 11-4 丽蝇蛹集金小蜂毒液对家蝇和棕尾别麻蝇血细胞延展的影响

Fig. 11-4 Effects of venom from *Nasonia vitripennis* with various concentrations on the spreading of hemocytes

from *Musca domestica* and *Sarcophaga peregrina* larvae

A 和 B: 家蝇幼虫浆血细胞和颗粒血细胞; C 和 D: 棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞和颗粒血细胞。A, B: Plasmatocytes and granular cells from *Musca domestica* larvae; C, D: Plasmatocytes and granular cells from *Sarcophaga peregrina* larvae.

蝶蛹金小蜂毒液对家蝇浆血细胞 ($F = 76.14, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 80.69, P = 0.0001$) 的存活均有显著影响, 毒液浓度对二者的存活也有显著影响 ($F = 165.75, P < 10^{-4}$; $F = 38.13, P < 10^{-4}$), 处理后时间对二者存活则无显著影响 ($F = 0.23, P = 0.64$; $F = 0.89, P = 0.35$)。丽蝇蛹集金小蜂对家蝇血细胞 ($F = 75.65, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 84.62, P = 0.0002$) 的存活有显著影响, 毒液浓度对二者的存活也有显著影响 ($F = 188.79, P < 10^{-4}$; $F = 47.33, P < 10^{-4}$), 处理后时间对二者存活则无显著影响 ($F = 0.37, P = 0.55$; $F = 0.60, P = 0.44$) (表 11-3)。

蝶蛹金小蜂毒液对棕尾别麻蝇浆血细胞 ($F = 71.47, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 84.88, P = 0.0001$) 的存活均有显著影响, 毒液浓度对二者的存活也有显著影响 ($F = 192.57, P < 10^{-4}$; $F = 57.41, P < 10^{-4}$), 处理后时间对二者存活则无显著影响 ($F = 0.01, P = 0.97$; $F = 0.92, P = 0.34$)。丽蝇蛹集金小蜂对棕尾别麻蝇血细胞 ($F = 60.06, P < 10^{-4}$) 和颗粒血细胞 ($F = 60.59, P < 10^{-4}$) 的存活有显著影响, 毒液浓度对二者的存活也有显著影响 ($F = 162.39, P < 10^{-4}$; $F =$

$= 42.35, P < 10^{-4}$), 处理后时间对二者存活则无显著影响 ($F = 0.22, P = 0.65; F = 1.19, P = 0.28$) (表 11-3)。

2.1.3 蝶蛹金小蜂的其它非寄主昆虫

蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液对中华稻蝗成虫、美洲大蠊成虫、瘤缘蜡若虫、假眼小绿叶蝉若虫、小菜蛾幼虫、大蜡螟幼虫、大螟幼虫、棉铃虫幼虫、家蚕幼虫、直纹稻苞虫幼虫、大猿叶虫幼虫、中华蜜蜂幼虫、黑翅土白蚁成虫、茶尺蠖幼虫血细胞的延展均无显著影响 (图 11-5 和 11-6)。

2.2 昆虫细胞系

2.2.1 Tn 细胞系

蝶蛹金小蜂毒液处理后, Tn 细胞的延展受到抑制, 细胞由梭形变成圆球形, 随处理时间的延长, 出现胞质颗粒化, 并引起细胞解体 (图 11-1 C 和 D)。蝶蛹金小蜂毒液可显著影响 Tn 细胞系的延展 ($F = 15.39, P = 0.0002$) 和存活 ($F = 17.05, P = 0.0001$)。毒液浓度对细胞延展 ($F = 438.88, P < 10^{-4}$) 和存活 ($F = 170.72, P < 10^{-4}$) 有显著影响, 随毒液处理浓度由 $0.0005 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ 升高至 $0.05 \text{ VRE}/\mu\text{l}$, 细胞延展率由近 100% 降至 5% 以下, 细胞死亡率由 0 升至 90% 以上, 处理后时间对细胞延展 ($F = 0.26, P = 0.61$) 和存活 ($F = 0.13, P = 0.72$) 均无显著作用 (图 11-7)。处理后 0.5 h, 蝶蛹金小蜂毒液抑制 50% 和 90% 的 Tn 细胞延展所需浓度分别为 0.0039 和 $0.0061 \text{ VRE}/\mu\text{l}$, 处理后 4 h, 所需要毒液浓度分别为 0.0033 和 $0.0057 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ 。处理后 0.5 h, 蝶蛹金小蜂毒液诱导 50% 和 90% 的 Tn 细胞死亡所需浓度分别为 0.0084 和 $0.052 \text{ VRE}/\mu\text{l}$, 处理后 4 h, 所需要毒液浓度分别为 0.0074 和 $0.0468 \text{ VRE}/\mu\text{l}$ (表 11-4)。丽蝇集金小蜂毒液对 Tn 细胞系的延展 ($F = 2.95, P = 0.09$) 和存活 ($F = 0.02, P = 0.89$) 均无显著影响 (图 11-7)。

2.2.2 Ha 细胞系

两种金小蜂毒液处理后, Ha 细胞的胞质均一变为颗粒化, 随处理时间的延展伴随细胞的解体 (图 11-1 G 和 H)。蝶蛹金小蜂 ($F = 11.11, P = 0.002$) 和丽蝇蛹集金小蜂 ($F = 7.93, P = 0.007$) 毒液对 Ha 细胞系的存活均有显著影响, 毒液浓度对细胞存活也有显著影响 ($F = 131.32, P < 10^{-4}, F = 160.87, P < 10^{-4}$), 处理时间对细胞存活均无显著影响 ($F = 0.03, P = 0.87, F = 0.31, P = 0.58$), 由二者对 Ha 细胞的 LC_{50} 来看, 蝶蛹金小蜂作用更强一些 (图 11-8; 表

11-4)。

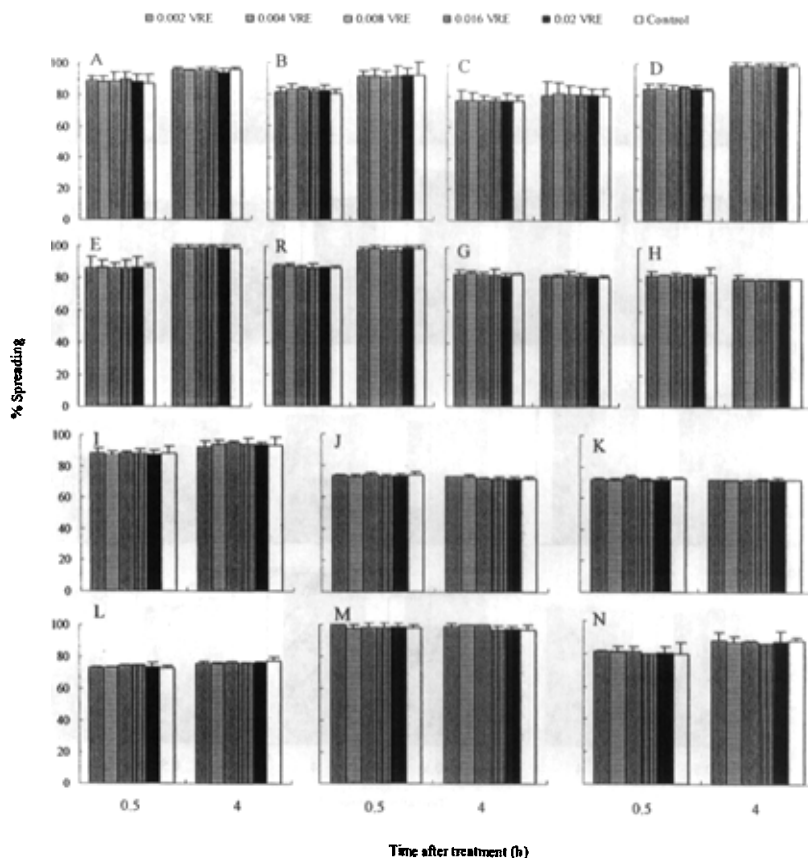


图 11-5 蝶蛹金小蜂毒液对其非寄主昆虫血细胞延展的影响

Fig. 11-5 Effects of venom from *Pteromalus puparum* with various concentrations on the spreading of hemocytes from factitious insects

其中 A~O: 蝶蛹金小蜂不同剂量毒液处理后 0.5 和 4 h, 中华稻蝗成虫、美洲大蠊成虫、黑翅土白蚁成虫、瘤缘蝽若虫、假眼小绿叶蝉若虫、小菜蛾幼虫、大蜡螟幼虫、大螟幼虫、棉铃虫幼虫、茶尺蠖幼虫、家蚕幼虫、直纹稻苞虫幼虫、大猿叶虫幼虫及中华蜜蜂幼虫血细胞的延展率。A ~ O: Spreading percent of hemocytes from *Oxya chinensis*, *Periplaneta americana*, *Odontotermes formosanus*, *Acanthocoris scaber*, *Empoasca vitis*, *Plutella xylostella*, *Galleria mellonella*, *Sesamia inferen*, *Helicoverpa armigera*, *Ectropis oblique*, *Bombyx mori*, *Parnara guttatus*, *Colaphellus bowringi* and *Apis cerana* after treated with various concentrations of *Pteromalus puparum* venom for 0.5 and 4 h, respectively.

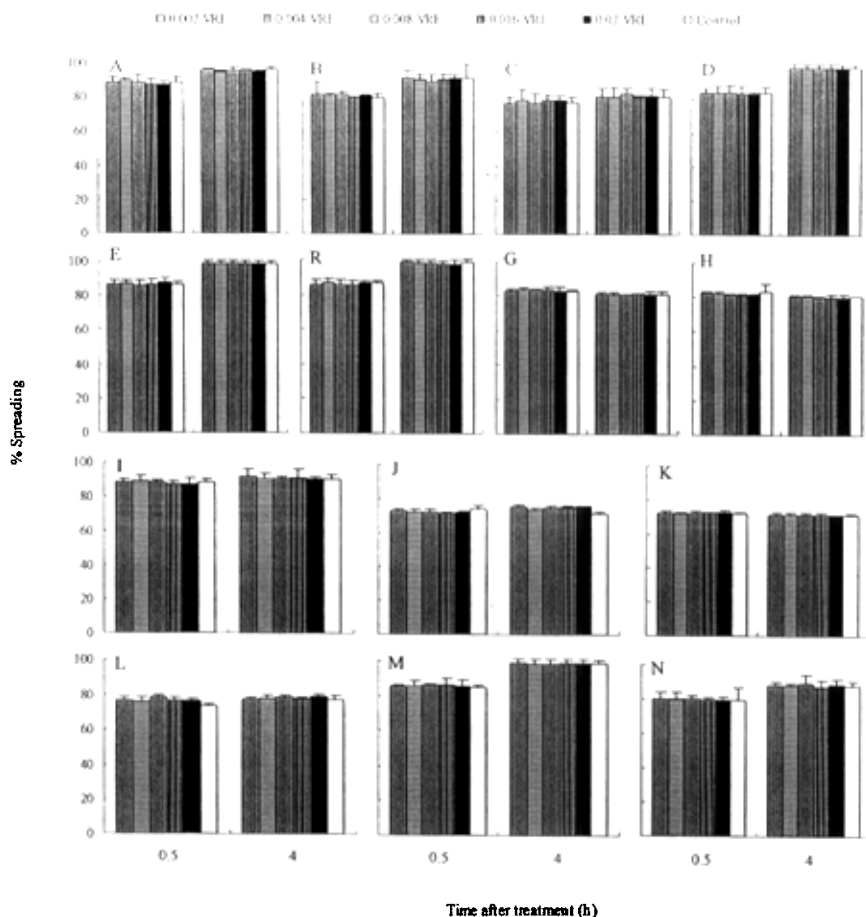


图 11-6 丽蝇蛹金小蜂毒液对其非寄主昆虫血细胞延展的影响

Fig. 11-6 Effects of venom from *Nasonia vitripennis* with various concentrations on the spreading of hemocytes

from factitious insects of *Pteomalus puparum*

其中 A ~ O: 蜚蠊金小蜂不同剂量毒液处理后中华稻蝗成虫、美洲大蠊成虫、黑翅土白蚁成虫、瘤缘蝽若虫、假眼小绿叶蝉若虫、小菜蛾幼虫、大蜡螟幼虫、大螟幼虫、棉铃虫幼虫、茶尺蠖幼虫、家蚕幼虫、直纹稻苞虫幼虫、大蓟叶虫幼虫、中华蜜蜂幼虫血细胞的延展率。A ~ O: Spreading percent of hemocytes from *Oxya chinensis*, *Periplaneta americana*, *Odontotermes formosanus*, *Acanthocoris scaber*, *Empoasca vitis*, *Plutella xylostella*, *Galleria mellonella*, *Sesamia inferens*, *Helicoverpa armigera*, *Ectropis oblique*, *Bombyx mori*, *Parnara guttatus*, *Colaphellus bowringi* and *Apis cerana* after treated with various concentrations of venom from *Nasonia vitripennis* for 0.5 and 4 h, respectively.

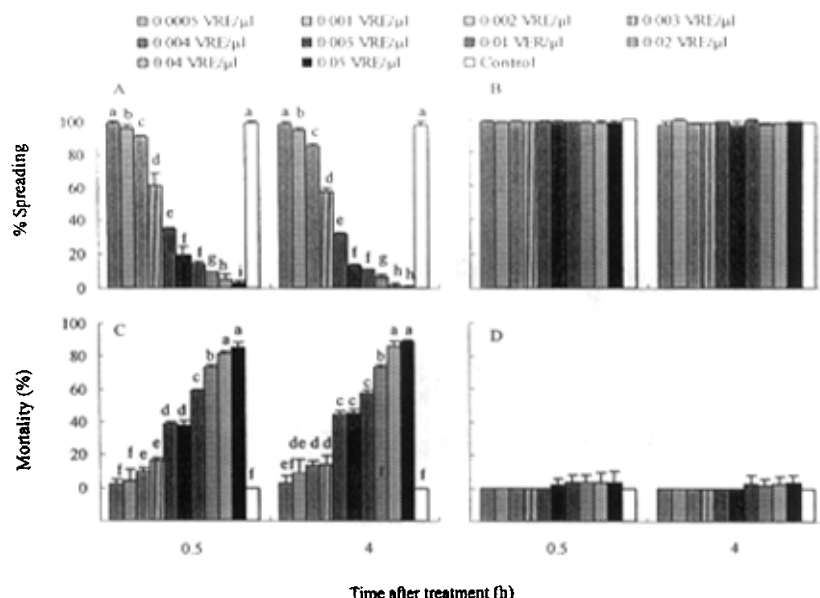


图 11-7 两种金小蜂毒液对 Tn 细胞系延展和存活的影响

Fig. 11-7 Effects of venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* with various concentrations on the spreading ability and viability of Tn cells *in vivo*

A 和 B: 蝶蛹金小蜂 (A) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (B) 处理后 Tn 细胞的延展率; C 和 D: 蝶蛹金小蜂 (A) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (B) 处理后 Tn 细胞的死亡率。A and B: the spreading percentages of the cells after treatment by venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis*, respectively. C and D: the mortality of the cells after treatment by venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis*, respectively.

3 讨论

寄生蜂毒液有一定的作用范围, 如 *Habrobracon* 毒液对其非寄主昆虫欧洲玉米螟 *Pyrausta nubilalis* 无麻痹作用, 而对其自然寄主 *Galleria* 则有持续麻痹作用 (Beard, 1952), 具外寄生性的啮小蜂 *Melittobia digitata* 毒液对其非自然寄主麻蝇离体浆血细胞和颗粒血细胞存活、粘着、延展以及形态无任何影响 (Rivers *et al.*, 2002)。但寄生蜂毒液的作用范围一般大于其寄主范围 (Jones & Coudron, 1993)。由本章的结果看来, 蝶蛹金小蜂毒液对 3 种非寄主昆虫血细胞和 Tn 细胞系的延展与存活及 Ha 细胞系的存活均有显著影响, 而对其它 14 种非寄主昆虫血细胞的延展均无显著影响。丽蝇蛹集金小蜂毒液仅对其 2 种寄主昆虫血细胞的延展和存活及 Ha 细胞系的存活有显著影响。由此看来, 蝶蛹金小蜂毒液对昆虫血

胞延展抑制的范围似更宽些。

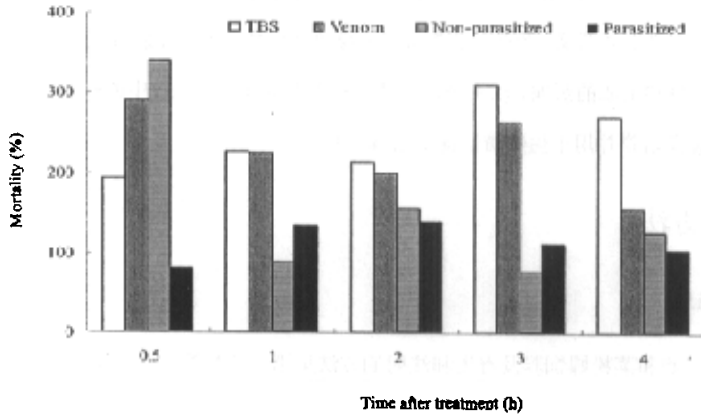


图 11-8 蝶蛹金小蜂 (A) 和丽蝇蛹集金小蜂毒液 (B) 对 Ha 细胞系死亡率的影响

Fig. 11-8 Effects of venoms from *Pteromalus puparum* (A) and *Nasonia vitripennis* (B) with various concentrations on the viability of Ha cells *in vivo*

由毒液作用能力看来,丽蝇蛹集金小蜂毒液对家蝇和棕尾别麻蝇幼虫浆血细胞延展的抑制能力要强于蝶蛹金小蜂毒液,而对颗粒血细胞延展的抑制能力却比蝶蛹金小蜂毒液弱(表 11-1, 表 11-2)。蝶蛹金小蜂毒液诱导 Ha 细胞死亡的能力要强于丽蝇蛹集金小蜂毒液(表 11-4)。由血细胞的敏感性看来,浆血细胞对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性:棕尾别麻蝇幼虫 > 家蝇幼虫 > 斜纹夜蛾幼虫;颗粒血细胞对蝶蛹金小蜂毒液的敏感性:斜纹夜蛾幼虫 > 棕尾别麻蝇幼虫 > 家蝇幼虫。浆血细胞和颗粒血细胞对丽蝇蛹集金小蜂毒液的敏感性:棕尾别麻蝇幼虫 > 家蝇幼虫 > 斜纹夜蛾幼虫(表 11-1 和 11-2)。这与 Rivers 等(1993)的研究有一定的相似性,对几种双翅目蝇类注射丽蝇蛹集金小蜂毒液表明,麻蝇 *Sarcophaga bullata* 对丽蝇蛹集金小蜂毒液最敏感,且幼虫、蛹和成虫的敏感性相同,家蝇的敏感性则相对较差。因此,不管是从生物学还是生理学角度看,麻蝇是比家蝇更适合丽蝇蛹集金小蜂的寄主昆虫。

丽蝇蛹集金小蜂毒液对蜜蜂成虫有很强的毒性,注射毒液后的蜜蜂未表现出麻痹症状,说明丽蝇蛹集金小蜂毒液通过非麻痹作用使昆虫死亡(Rivers 等,1993)。而我们研究表明,此毒液对蜜蜂幼虫血细胞的延展和存活均无显著作用,可能蜜蜂血细胞不存在丽蝇蛹集金小蜂毒液的作用位点。

表 11-4 不同处理浓度的两种金小蜂毒液对两种昆虫细胞系的影响

Table 11-4 Responses of Tn and Ha cells to venoms from *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* with various concentrations *in vivo*

Venom	Cell		0.5 h	4 h
Pp	Tn	$10^{-2} IC_{50}$ (VRE/ μ l)	0.39 (0.25, 0.47)	0.33 (0.26, 0.41)
		$10^{-2} IC_{90}$ (VRE/ μ l)	0.61 (0.45, 0.80)	0.57 (0.46, 0.70)
		Slope $\pm$ SE	5.16 $\pm$ 0.94	5.28 $\pm$ 0.82
		P	< 10^{-4}	< 10^{-4}
		$10^{-2} LC_{50}$ (VRE/ μ l)	0.84 (0.40, 1.50)	0.74 (0.28, 1.52)
		$10^{-2} LC_{90}$ (VRE/ μ l)	5.20 (3.20, 7.64)	4.68 (2.45, 7.57)
	Ha	Slope (SE)	1.62 $\pm$ 0.30	1.60 $\pm$ 0.33
		P	< 10^{-4}	< 10^{-4}
		$10^{-2} LC_{50}$ (VRE/ μ l)	0.24 (0.14, 0.40)	0.22 (0.11, 0.21)
		$10^{-2} LC_{90}$ (VRE/ μ l)	0.40 (0.23, 0.63)	0.40 (0.20, 0.69)
		Slope $\pm$ SE	5.95 $\pm$ 0.91	5.18 $\pm$ 0.89
		P	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Nv	Tn	$10^{-2} IC_{50}$ (VRE/ μ l)	> 5	> 5
		$10^{-2} IC_{90}$ (VRE/ μ l)	> 5	> 5
		$10^{-2} LC_{50}$ (VRE/ μ l)	> 5	> 5
		$10^{-2} LC_{90}$ (VRE/ μ l)	> 5	> 5
	Ha	$10^{-2} LC_{50}$ (VRE/ μ l)	0.45 (0.39, 0.52)	0.43 (0.31, 0.58)
		$10^{-2} LC_{90}$ (VRE/ μ l)	0.73 (0.64, 0.83)	0.84 (0.63, 1.10)
		Slope $\pm$ SE	6.16 $\pm$ 0.77	4.44 $\pm$ 0.69
		P	< 10^{-4}	< 10^{-4}

蝶蛹金小蜂毒液对 Tn 细胞系的延展和存活均有显著抑制作用。丽蝇蛹集金小蜂毒液对 Tn 细胞系的延展和存活均无显著影响，这与 Rivers 等（1993 和 1999）的研究相反，可能来源于同一昆虫不同组织的细胞系对同一种寄生蜂毒液也会有不同反应。两种金小蜂毒液对 Ha 细胞均有较强毒性，且蝶蛹金小蜂毒液毒性更强一些，但两种毒液对棉铃虫血细胞的延展及存活均无显著影响，可能棉铃虫血细胞不存在两种毒液的作用位点，而其卵巢来源的 Ha 细胞系则可能存在其作用位点。

由本章研究结果看来，内寄生蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围似更宽，这可能也与内寄生蜂和外寄生蜂的习性有关。内寄生蜂卵和幼蜂生活于寄主血淋巴中，直接面对寄主血细胞的作用，因而在未有其它主动抑制因子（如 PDV 等）的情况下，毒液须抑制寄主血细胞的免疫反应或通过免疫逃避，才能保证蜂卵和孵化及幼蜂的正常发育。而外寄生蜂的卵和幼蜂生活于寄主体表，寄主血细胞不直接作用于其上，故在长期进化过程中，毒液主要功能转化为麻痹作用、调节寄主生长发育及其体内营养状况，为寄生蜂幼蜂的发育提供合适的生理环

境 (Coudron & Brandt, 1996; Doury *et al.*, 1995; Marris *et al.*, 2000; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; b; Rinehart & Denlinger, 2002; Rivers & Denlinger, 1994; 1995 a)。而尽管外寄生蜂毒液还具有抑制寄主血细胞免疫和体液免疫的功能 (Richards & Edward, 2000 a; Rivers *et al.*, 2002), 并能诱导昆虫细胞系的死亡 (Rivers *et al.*, 1993; 1999), 但这可能是其次要功能。这也是本章研究结果中, 蝶蛹金小蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围较丽蝇蛹集金小蜂宽的原因所在。蝶蛹金小蜂毒液可抑制斜纹夜蛾幼虫血细胞的延展, 可能与斜纹夜蛾与菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞有相似的结构有关。蝶蛹金小蜂毒液可抑制丽蝇蛹集金小蜂寄主——家蝇和棕尾别麻蝇血细胞的延展, 而高剂量的丽蝇蛹集金小蜂毒液也可抑制蝶蛹金小蜂寄主血细胞的延展 (第八章), 说明两种毒液中可能有相同的活性组分。以上推断均需做进一步研究才能证实。

两种金小蜂毒液对均可诱导 Ha 细胞的死亡, 故此两种毒液中均存在细胞毒性因子, 而此两种毒液中的细胞毒性因子是否相同? 二者诱导细胞死亡的机理是否相同? 此细胞因子与 Rivers 等 (1993 和 1999) 和 Parkinson 和 Weaver (1999) 所报道的毒液中的细胞毒性因子有何关系? 都值得做进一步研究。

第十二章 蝶蛹金小蜂毒液对两种寄主蛹表皮主要物质含量与组成的影响

寄生蜂的寄生可调控寄主体内的营养物质及寄主的发育以满足其幼蜂发育之需要 (Rivers & Denlinger, 1994; Coudron & Brandt, 1996; Alleyne & Beckage, 1997; Coudron *et al.*, 1997; Coudron *et al.*, 1999; Richards & Edwards, 1999 b; Marris *et al.*, 1999; Steiner, *et al.*, 1999)。寄主被寄生后, 血淋巴及脂肪体内的一些营养物质, 如蛋白质、脂类、游离氨基酸、脂肪体糖原及海藻糖等含量的变化已有较详研究 (Dahlman, 1970, 1975; Dahlman & Vinson, 1976; Vinson, 1990; Guerra *et al.*, 1993; Rivers & Denlinger, 1994; 1995; Brandt *et al.*, 1996; Richard & Edwards, 1999 b; 吕慧平等, 2000; Nakamatsu, 2001; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a, b; 2004; Thompson & Dahlman, 1998)。而寄主表皮中营养物质的变化却极少有人研究。寄生蜂幼虫发育过程中是否可利用寄主表皮中的可溶性蛋白、表皮蛋白及脂类? 寄生蜂如何调控这些物质的变化? 这些问题均未引起前人的注意。

寄生调控寄主发育的研究也仅反映在寄主体重增长、蜕皮及体内激素水平受到影响, 且对蛹期寄主在不破坏虫体的前提下, 很难确定寄生对其发育进程的影响, 而昆虫表皮碳氢化合物则可作为昆虫发育的指示物质, 并可用于昆虫发育历期的推测 (Chen *et al.*, 1990; Densena *et al.*, 1999)。寄生蜂的蛹期寄主受寄前后的发育进程是否可通过表皮碳氢化合物含量与组成的变化来确定? 我们做了此方面的尝试, 以期由表皮物质的组成和含量的变化来反映寄主被寄生的发育进程及体内营养的变化。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、菜粉蝶及柑桔凤蝶的来源及饲养方法见第二章和第三章。

1.2 寄生及注射毒液

蝶蛹金小蜂对菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹的寄生方法及蝶蛹金小蜂毒液的提取方法见第二章。注射蝶蛹金小蜂毒液方法参照第七章。

1.3 表皮的制备

参照 Missios 等 (2000) 的方法, 分别解剖 5 头寄生和注射毒液后 0.5、1、2、3、4 和

5 d 菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹的表皮, 尽去内表皮的肌肉及它组织, 并以去离子水清洗 10 次, 干燥后, 用以提取表皮中的蛋白或脂类, 另取 5 头同期未寄生或注射 TBS 蛹作对照。

1.4 表皮蛋白和可溶性蛋白提取及含量测定

上述表皮称量后于液氮中研磨成粉, 以 2 ml 高盐缓冲液 (0.5 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 内含 1 mM 苯甲基磺酰氟 PMSF, 丝氨酸蛋白酶抑制剂) 及苯基硫脲 (PTU), 并以 1 ml 冰冷的去离子水洗 10 次, 收集所有淋洗液, 脱盐后, 冷冻浓缩至体积约为 500 μ l, 即为表皮中的可溶性蛋白提取液, 剩余的表皮收集后用于表皮蛋白的提取。

上述剩余表皮以去垢剂和离液剂 (1% SDS; 7M 脲, 5 mM Tris (pH 8.6), 1% Triton X-100 或去离子水) 500 μ l 于 4℃ 提取 16 h, 取出后, 再以 500 μ l 上述溶液以同样条件提取, 合并 2 次提取溶液, 冷冻浓缩至 500 μ l, 即为表皮蛋白粗提液。表皮蛋白含量测定采用 Folin 酚法, 可溶性蛋白的定量采用 Bradford (1976) 的方法。

1.5 表皮脂类的测定方法

参照 Nakamatsu & Tanaka (2003) 的方法。取一定量 1.3 中制备的表皮, 液氮研磨成粉后, 加 0.2 ml 氯仿抽提 30 min, 10000 g 离心 5 min, 取出上清, 加入 0.5 ml 浓 H_2SO_4 , 沸水浴 10 min, 冷却至室温后, 加入 1 ml 芳草醛溶液 (13 mM 芳草醛溶于 14 M 磷酸中), 显色 30 min 后, 测 OD_{547} , 并以 2.5 mg/ml 胆固醇作标准曲线。

1.6 表皮碳氢化合物的提取及检测

分别取寄生后 0.5, 1, 2, 3, 4 和 5 d 的菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹, 以同日龄未寄生蛹作对照, 各处理蛹均取 3 头。蛹先以蒸馏水漂洗 3 遍后, 再以去离子水漂洗 3 次, 滤纸充分吸干水分后, 菜粉蝶蛹单头置于经 3 次蒸馏的正己烷洗涤 3 次的 10 $\times$ 35 mm 的玻璃瓶中, 加入经 3 次蒸馏的正己烷 0.5 ml。柑桔凤蝶蛹置于经 3 次蒸馏的正己烷洗涤至少 3 次的 20 $\times$ 75 mm 的玻璃瓶中, 加入经 3 次蒸馏的正己烷 1 ml, 以上样品均提取 25 min。取出蛹, 将提取液真空抽干, 加入 10 μ l 经 3 次蒸馏的正己烷, 充分溶解管壁上的样品, 即为表皮碳氢化合物的提取物。表皮碳氢化合物的分析采用气相色谱-质谱联用仪 Agilent GC (6890 N) - MS (5793 N)。表皮碳氢化合物样品以平头微量注射器 (Agilent) 吸取 1 μ l 无分流进样, 进样口温度为 250℃。色谱柱为 HP-5 MS 弹性石英毛细管柱 (柱长 30 m, 内径为 0.25 mm, 膜厚度为 0.25 μ m), 柱温采用程序升温: 50℃ (2min) $\underline{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200℃ $\underline{3^\circ\text{C}/\text{min}}$ 270℃ (20min)。载气采用 99.999% 高纯氮气, 柱压为 7.05 psi; 检测器为 FID 检测器, 温度为 300℃, 燃烧

气为氢气，流速为 40 ml/min，空气流速为 350 ml/min。气谱/质谱接口温度为 280℃；EI 离子源，电离能 70 eV，采用全扫描。

通过化学工作站用每一成分的质谱图与 NIST98 谱库中的标准化化合物的质谱图进行联机检索定性，并据峰面积对各物质进行相对定量。

1.7 数据分析

数据采用 DPS 数据分析软件进行方差分析、*t* 检验等统计分析(唐启义和冯明光, 2002)。

2 结果

2.1 表皮蛋白和表皮中可溶性蛋白

蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹 ($F=0.22$, $P=0.64$) 和柑桔凤蝶蛹 ($F=2.07$, $P=0.16$) 表皮蛋白含量均无显著影响, 注射毒液对菜粉蝶蛹 ($F=0.81$, $P=0.37$) 和柑桔凤蝶蛹 ($F=1.71$, $P=0.20$) 表皮蛋白含量也无显著影响。菜粉蝶蛹被寄生后 1 d, 表皮蛋白含量均显著降低, 而寄生后 0.5, 2, 3, 4, 5 d, 其表皮蛋白含量与对照并无显著差异 (图 12-1)。注射毒液后 1 和 2 d, 菜粉蝶表皮蛋白含量显著升高, 而注射后 0.5, 3, 4, 5 d, 表皮蛋白含量与对照均无显著差异 (图 12-1)。柑桔凤蝶蛹被寄生或注射蝶蛹金小蜂毒液后 1 d, 其表皮蛋白含量与对照相比显著下降, 而注射后 0.5, 2, 3, 4 和 5 d 其含量与对照无显著差异 (图 12-2)。

寄生或注射毒液后, 可导致菜粉蝶蛹表皮中可溶性蛋白含量的显著下降 ($F=19.60$, $P=0.0001$; $F=21.33$, $P=0.0001$) 和柑桔凤蝶蛹表皮中可溶性蛋白含量的显著升高 ($F=26.05$, $P<10^{-4}$; $F=12.50$, $P=0.001$)。菜粉蝶蛹被寄生或注射毒液后 1~5 d, 表皮中可溶性蛋白的含量均显著低于未寄生或注射 TBS 的同期对照蛹 (图 12-1)。柑桔凤蝶蛹被寄生后 1~5 d, 表皮中可溶性蛋白含量均显著高于同期未寄生的对照蛹, 注射毒液后 1, 3 和 4 d, 柑桔凤蝶蛹表皮中可溶性蛋白的含量均显高于同期注射 TBS 的蛹 (图 12-2)。

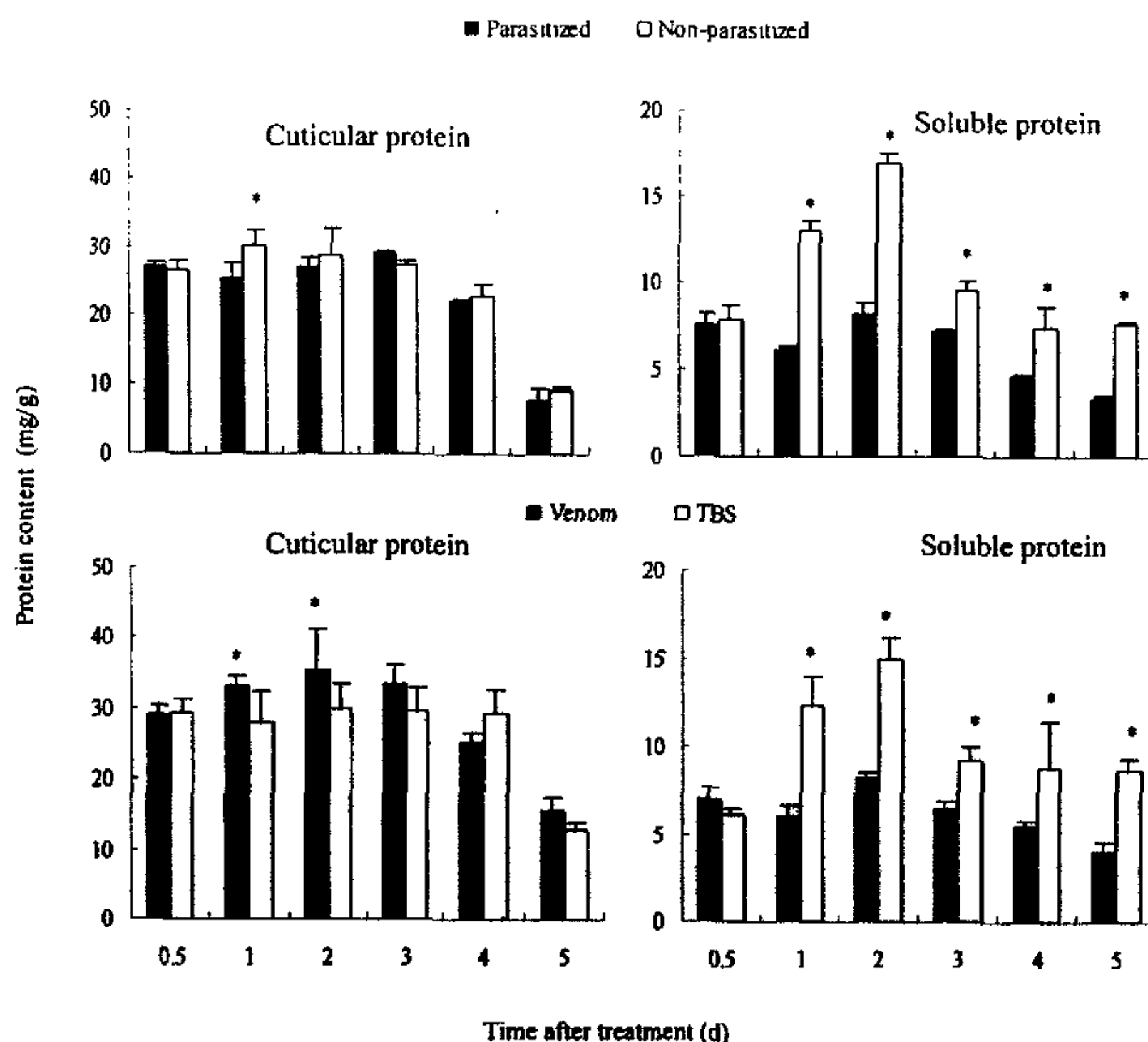


图 12-1 蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹表皮蛋白和表皮中可溶性蛋白含量的影响

 Fig. 12-1 Effects of parasitization and venom injection on the titers of cuticular protein and soluble protein in the cuticle of *Pieris rapae* pupae

2.2 表皮脂类

寄生可引起菜粉蝶 ($F = 5.09$, $P = 0.03$) 和柑桔凤蝶蛹 ($F = 7.95$, $P = 0.008$) 表皮脂类含量显著降低, 注射毒液对菜粉蝶蛹 ($F = 0.03$, $P = 0.87$) 和柑桔凤蝶蛹 ($F = 2.97$, $P = 0.09$) 表皮脂类含量则无显著影响。菜粉蝶蛹被寄生后, 表皮脂类含量于寄生后 1 d 与同期未寄生对照蛹相比显著升高, 寄生后 2~4 d 则显著下降, 注射毒液后 1 d 与同期未寄生对照蛹相比显著升高, 注射后 3 d 显著下降 (图 12-3)。柑桔凤蝶蛹被寄生后 2~5 d 和注射毒液后 3~4 d, 其表皮中脂类含量与同期未寄生蛹相比显著下降 (图 12-4)。

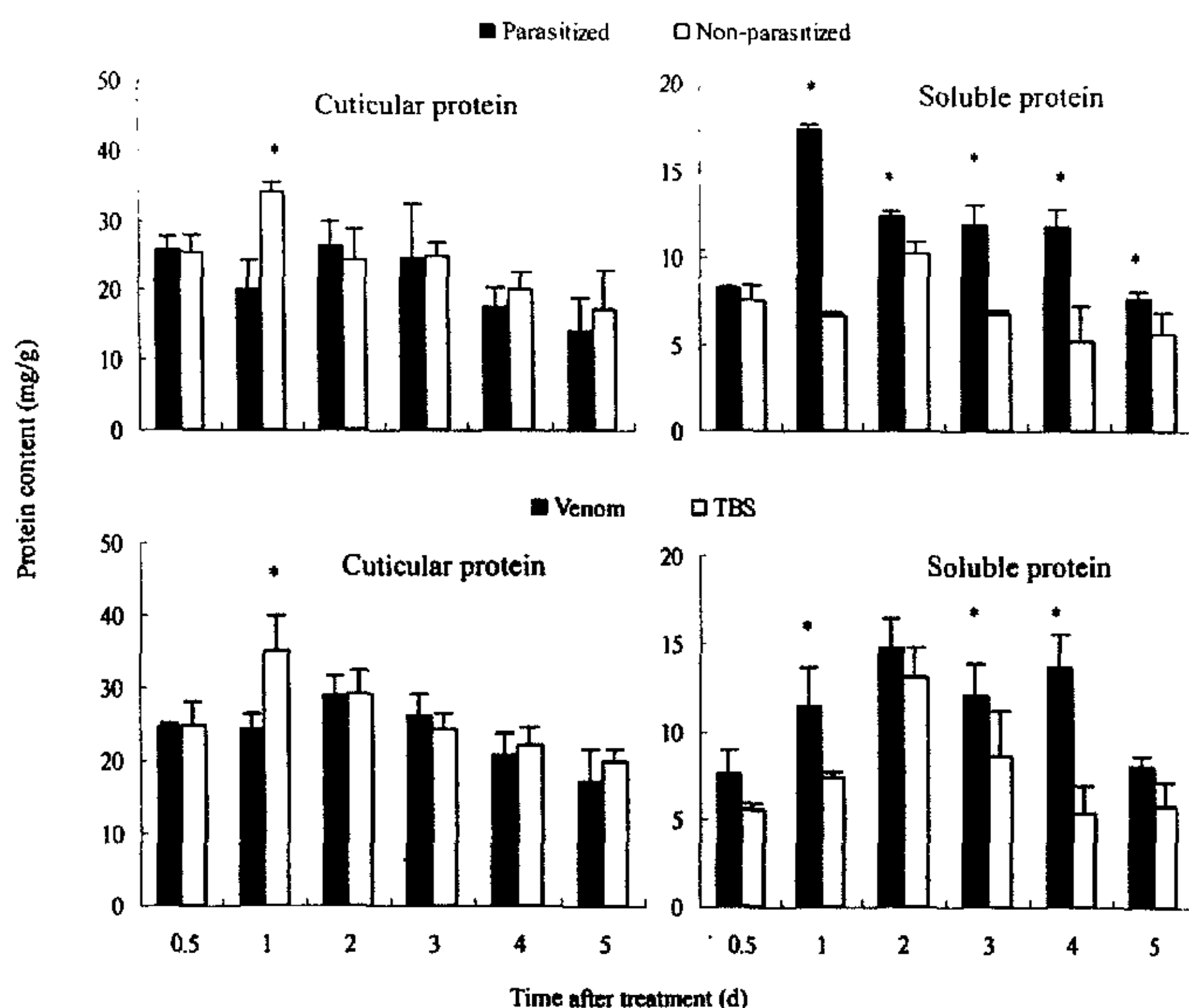


图 12-2 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹表皮蛋白和表皮中可溶性蛋白含量的影响

Fig. 12-2 Effect of parasitization and venom injection on the contents of cuticular protein and soluble protein in the cuticle of *Papilio xuthus* pupae

2.3 表皮碳氢化合物

菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物约有 17 种, 主要为烃类, 有 14 种, 含量占表皮碳氢化合物总量的 90% 以上, 杂环类物质、酯类和酮类各一种, 共占表皮碳氢化合物总含量的 6% 左右。菜粉蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 表皮碳氢化合物的种类及组成均无显著变化 (表 12-1 和图 12-5)。就各类物质而言, 寄生蛹表皮中烃类、酯类和酮类的含量于寄生后 0.5 ~ 5 d 与同期未寄生对照蛹相比均无显著变化, 而杂环类物质的含量则于寄生后 3 d 显著下降 (图 12-6)。蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹表皮中烃类 ($F=0.73$, $P=0.41$)、酮类 ($F=0.56$, $P=0.47$)、酯类 ($F=0.91$, $P=0.36$) 及杂环类物质 ($F=0.05$, $P=0.83$) 的相对含量均无显著影响 (图 12-6)。

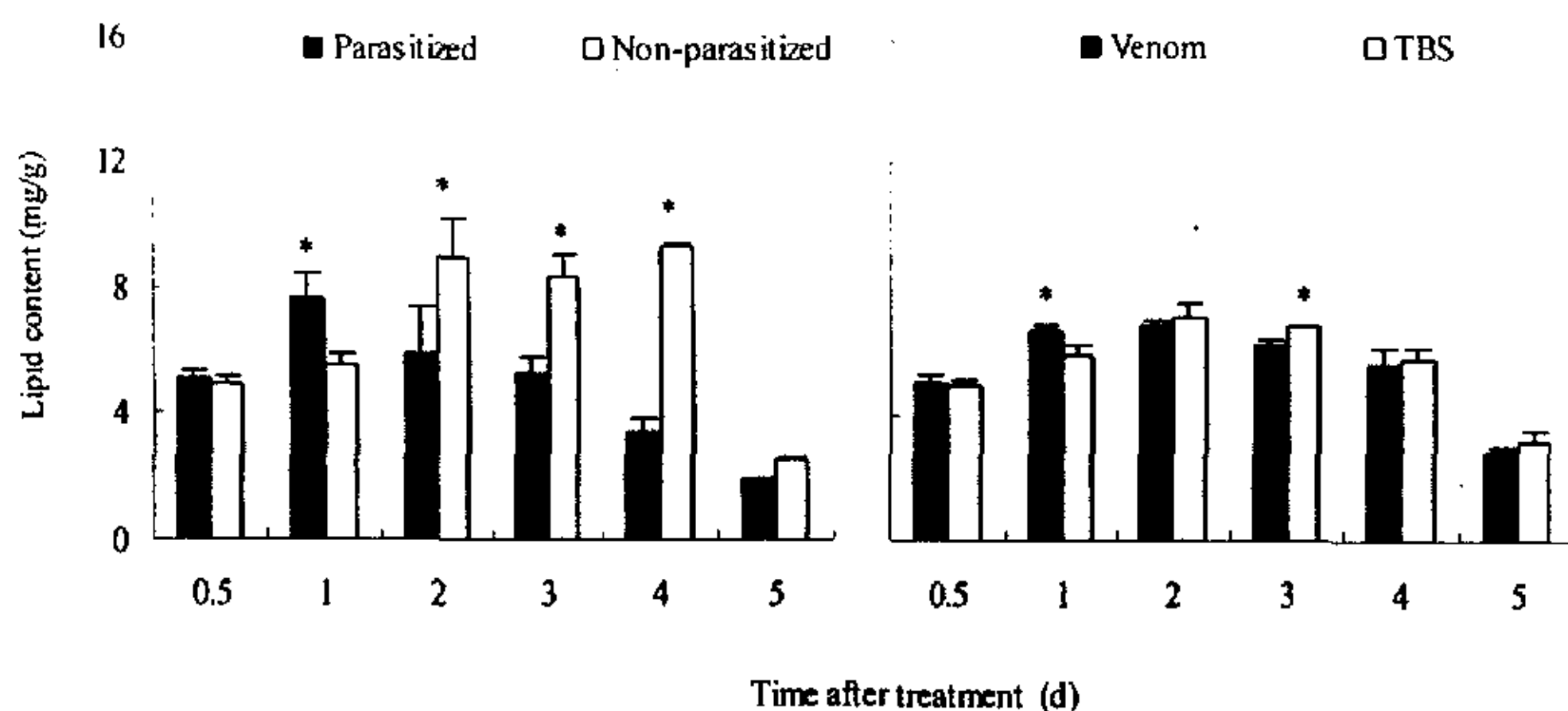


图 12-3 蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对菜粉蝶蛹表皮脂类含量的影响

Fig. 12-3 Effects of parasitization or injected with venom from *P. puarum* on the content of lipid in cuticle of *Pieris rapae* pupae

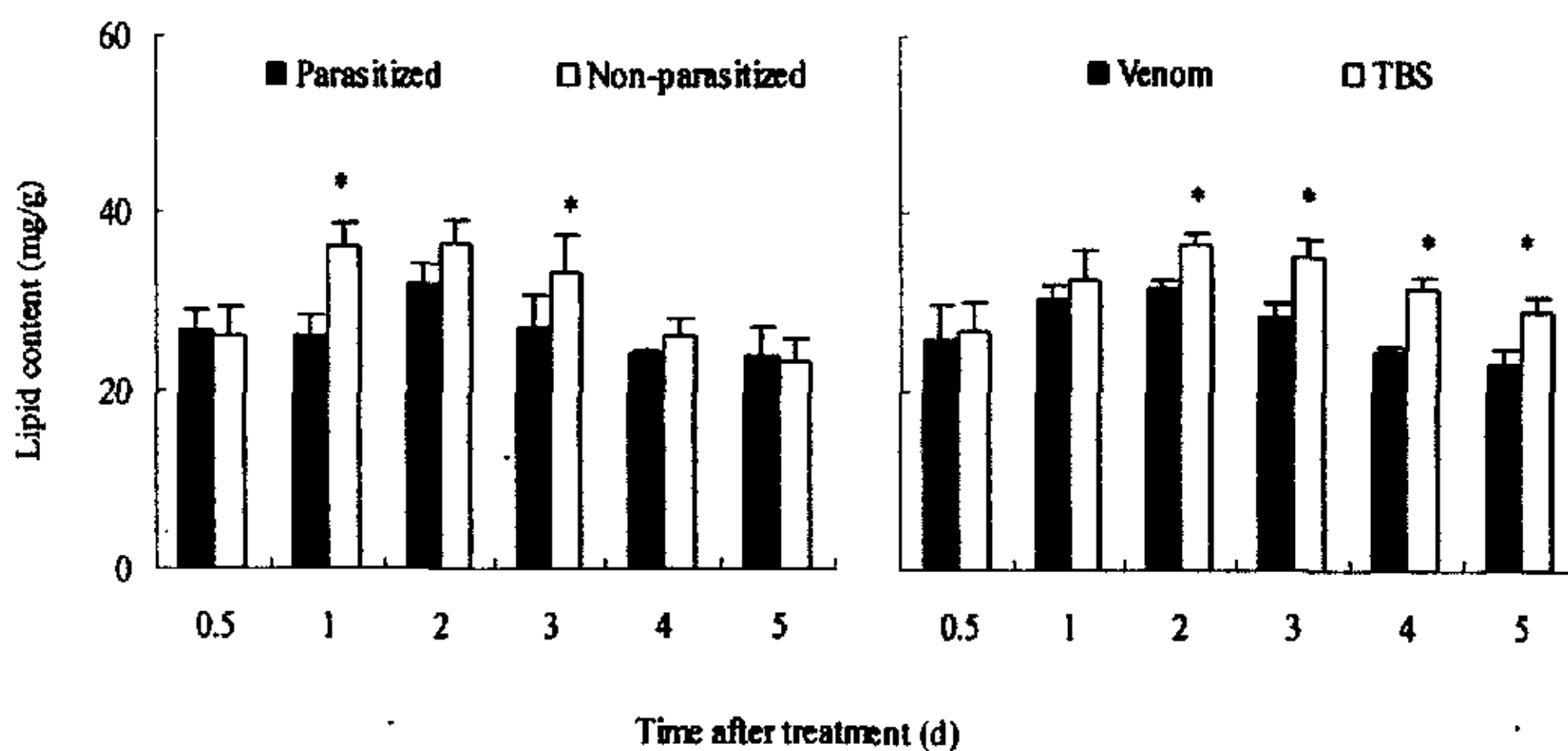


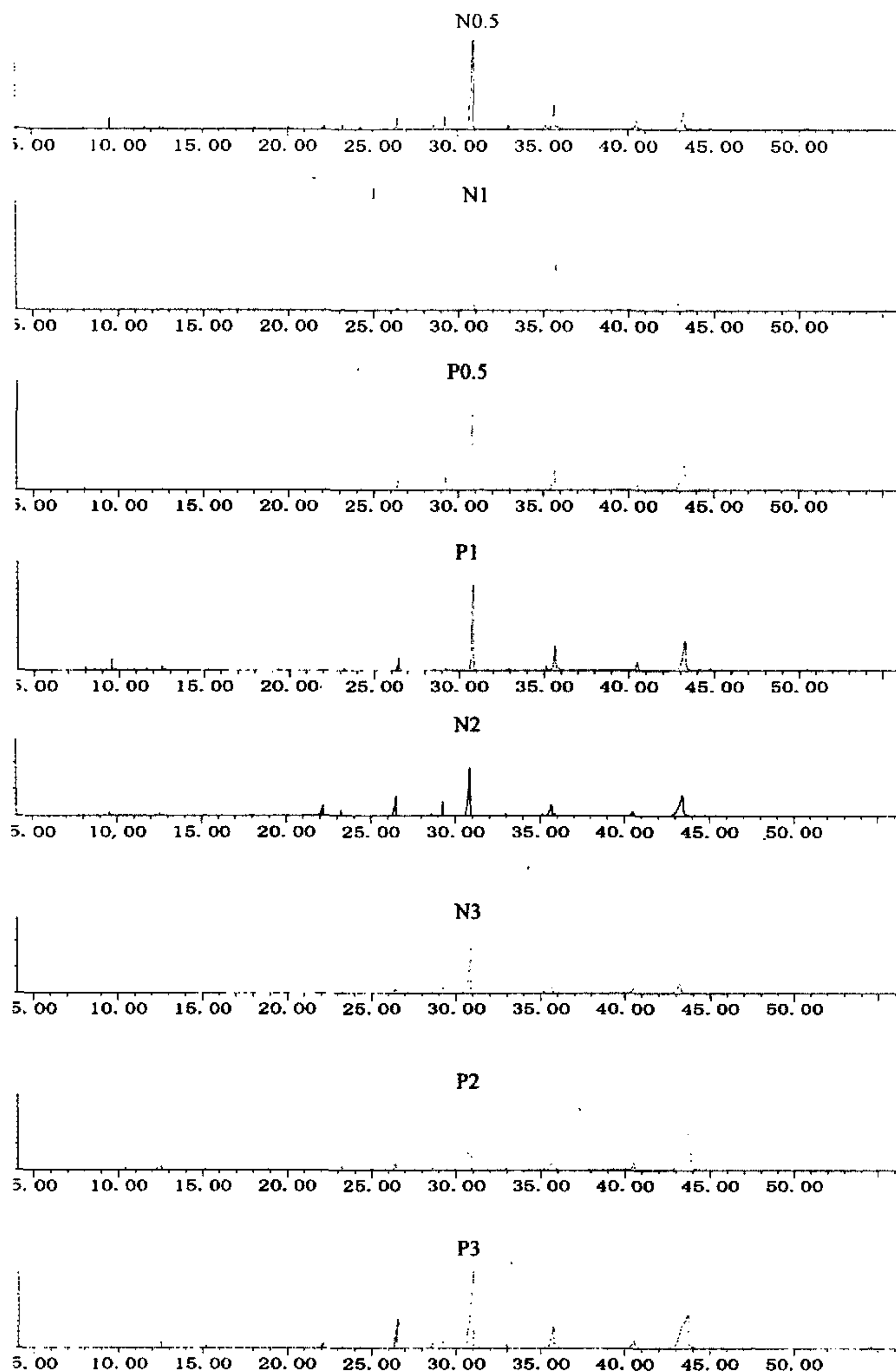
图 12-4 蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对柑桔凤蝶蛹表皮脂类含量的影响

Fig. 12-4 Effects of parasitization or venom injection on the content of lipid in cuticle of *Papilio xuthus* pupae

表 12-1 菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物的种类及其寄生前后相对含量的变化

 Table 12-1 Effects of parasitization on the compose of cuticular hydrocarbon from *Pieris rapae* pupae

No.	Stage time (min)	Chemical compounds	Relative content in parasitized pupae (%)	Relative content in non-parasitized pupae (%)
1	20.00	Heptadecane	0.17 ± 0.29 a	0.09 ± 0.13 a
2	20.06	Tetracosane	0.42 ± 0.42 a	0.38 ± 0.51 a
3	22.15	Heneicosane	0.66 ± 0.56 a	0.77 ± 0.85 a
4	23.25	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	0.49 ± 0.45 a	0.72 ± 0.59 a
5	24.27	Hexacosane	0.20 ± 0.16 a	0.28 ± 0.32 a
6	26.34	1- Docosene	2.08 ± 2.49 a	1.44 ± 1.52 a
7	26.44	Heptacosane	3.55 ± 2.00 a	3.30 ± 2.18 a
8	28.60	Heneicosane	0.81 ± 0.30 a	0.86 ± 0.34 a
9	29.27	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexa ene,2,6,10,15,19,23,-hexameth yl, (all-E)-	1.94 ± 2.30 a	2.42 ± 2.02 a
10	30.85	Octacosane	32.76 ± 12.05 a	39.45 ± 12.88 a
11	32.96	Triacontane (a)	1.18 ± 0.81 a	1.35 ± 0.76 a
12	35.24	15-Nonacosanone	1.20 ± 0.79 a	1.55 ± 0.83 a
13	35.68	Triacontane (b)	13.22 ± 8.84 a	13.98 ± 11.25 a
14	40.51	Oxirane, Heptadecyl-	3.72 ± 1.82 a	3.04 ± 1.78 a
15	43.17	9-Tricosene, (z)-	34.91 ± 18.77 a	27.79 ± 15.90 a
16	50.51	E-11(13-Methyl)tetradecen-1- ol acetate	1.49 ± 2.48 a	1.69 ± 3.05 a
17	54.68	17-Pentatriacontene	1.28 ± 1.15 a	0.81 ± 0.85 a



(续图)

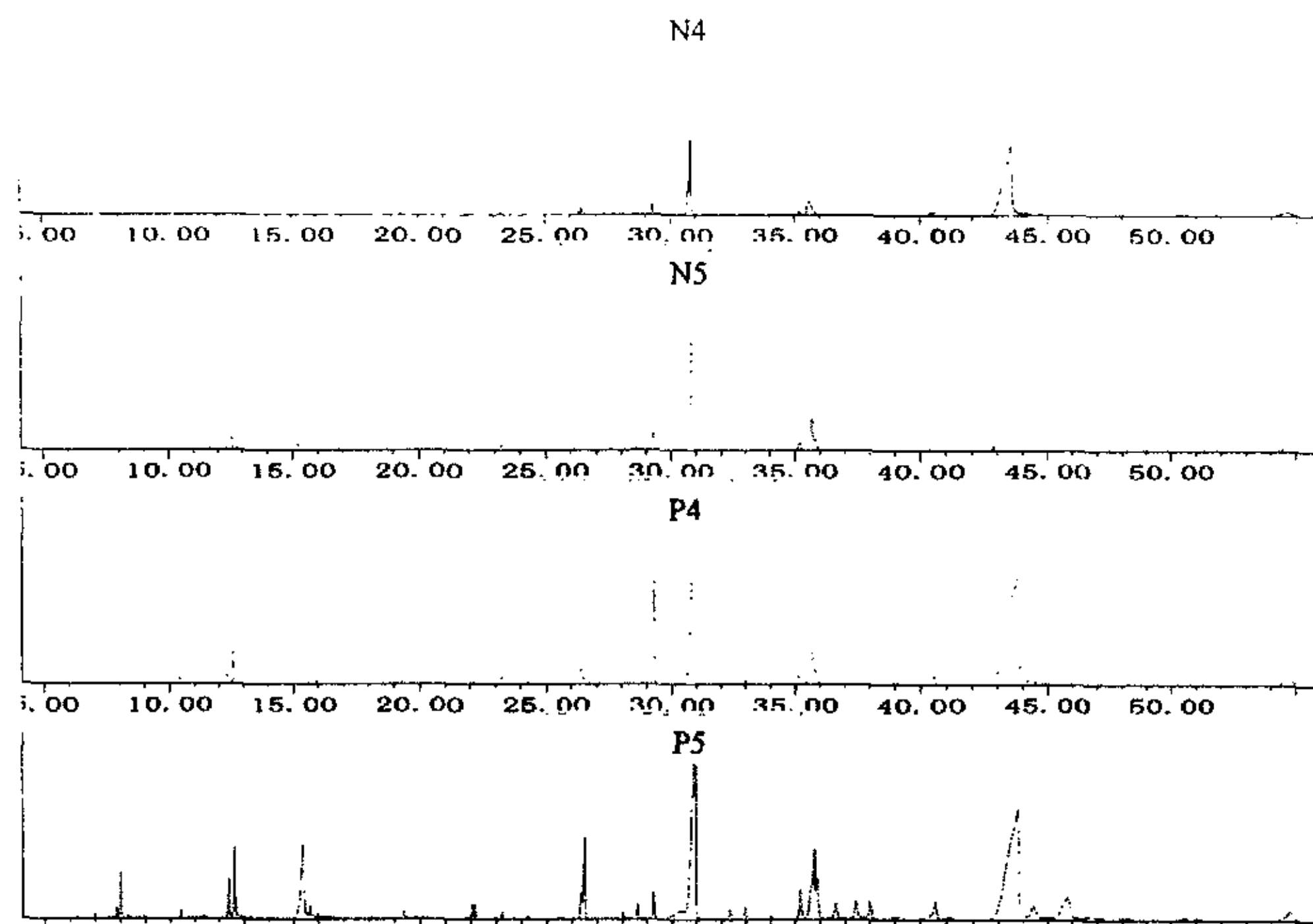


图 12-5 菜粉蝶蛹寄生后不同时间表皮碳氢化合物的总离子流图

Fig. 12-5 The GC-MS total ionic chromatogram of cuticular hydrocarbon from *Pieris rapae* after parasitization by *Pteromalus puparum*

$P_{0.5} \sim P_5$: 寄生后 0.5 d ~ 5 d 蛹; $N_{0.5} \sim N_5$: 0.5 d ~ 5 d 的未寄生蛹。图 12-7 同之。图 $P_{0.5} \sim P_5$: Pupae after parasitization for 0.5 to 5 days; $N_{0.5} \sim N_5$: Non-parasitization pupae at same age. The same for Fig. 12-7.

柑桔凤蝶蛹表皮碳氢化合物约有 18 种, 以烃类为主, 有 13 种, 含量约占表皮碳氢化合物总量的 50%以上, 醇类和杂环类物质各一种, 各占表皮碳氢化合物总量的 20%以上, 有机酸 1 种, 酯类 2 种, 占表皮碳氢化合物总量的 5%左右 (表 12-2 和图 12-7)。柑桔凤蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 其表皮碳氢化合物的苯甲酸二-2-乙基庚酯 Bis(2-ethylhexyl)phthalate、正二十六烷 Hexacosane 和正二十七烷 Heptacosane 的含量与未寄生对照蛹相比显著升高, 而十七烷基环氧乙烷 Oxirane, heptadecyl-的含量显著降低 (图 12-8)。就各类物质而言, 蝶蛹金小蜂的寄生后 0.5 ~ 5 d, 柑桔凤蝶蛹表皮中烃类、醇类、酯类及有机酸类相对含量与同期未寄生对照蛹相比均无显著差异, 而寄生后 0.5 和 1 d 杂环类物质相对含量与同期未寄生对照蛹相比显著下降。蝶蛹金小蜂的寄生对柑桔凤蝶表皮中烃类 ($F = 0.70$, $P = 0.42$)、醇类 ($F = 0.39$, $P = 0.54$)、酯类 ($F = 2.70$, $P = 0.11$) 及有机酸类 ($F = 1.40$, $P = 0.25$) 的相对含量均无显著影响, 而对杂环类物质的相对含量有显著影响 ($F = 5.17$, $P = 0.03$) (图 12-9)。

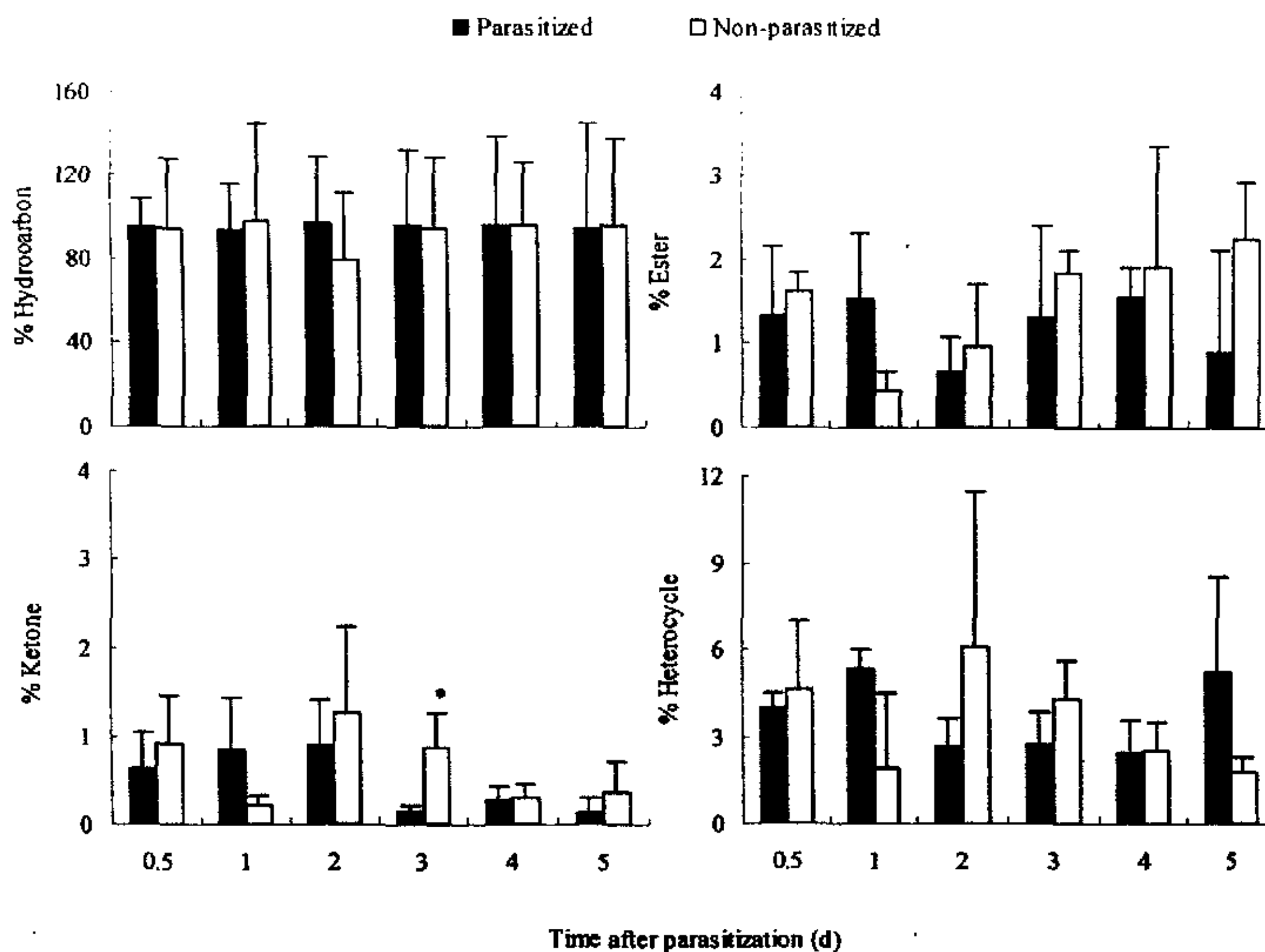


图 12-6 蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物相对含量的影响

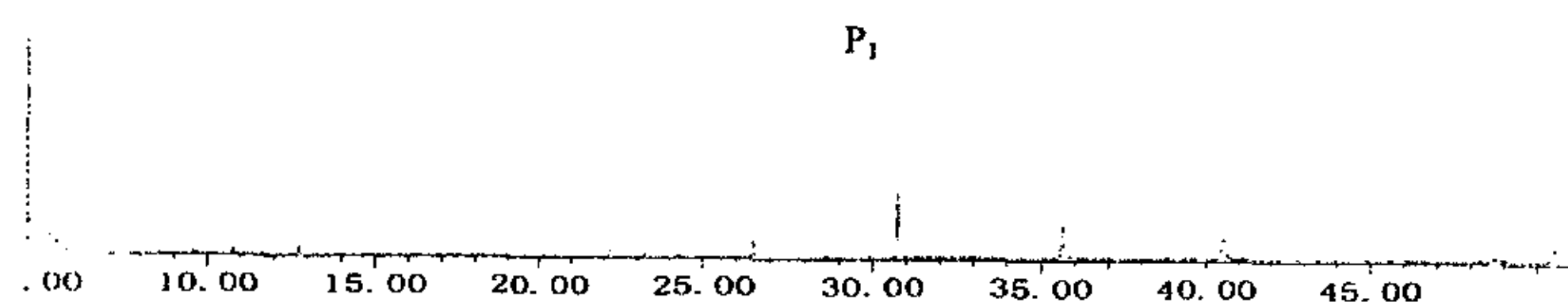
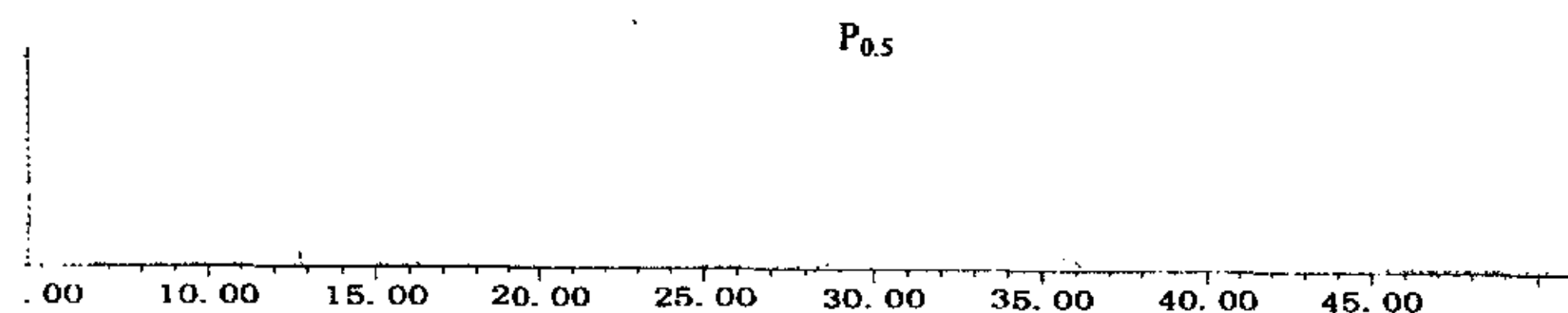
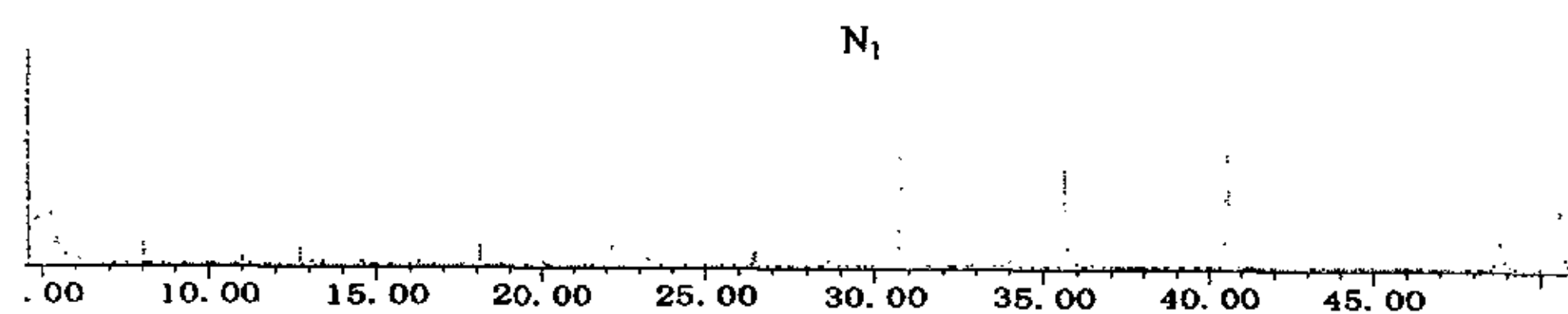
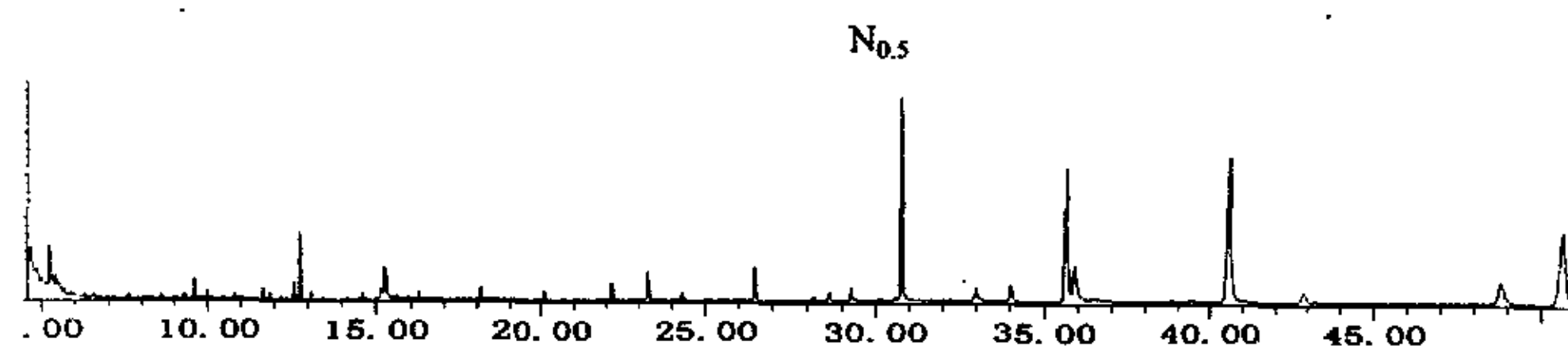
 Fig. 12-6 Effect of parasitization on the relative contents of hydrocarbon from *Pieris rapae* pupae

表 12-2 柑桔凤蝶蛹表皮碳氢化合物的种类及其寄生前后相对含量的变化

 Table 12-2 Effects of parasitization on the compose of cuticular hydrocarbon from *Pieris rapae* pupae

No.	Stage time (min)	Chemical compounds	Relative content in parasitized pupae (%)	Relative content in non-parasitized pupae (%)
1	12.58	N-Hexadecanoic acid	1.87 ± 2.08 a	1.18 ± 1.36 a
2	12.78	Dibutyl phthalate	1.60 ± 1.38 a	1.45 ± 0.75 a
3	16.25	Docosane	0.41 ± 0.40 a	0.32 ± 0.18 a
4	18.10	Nonadecane	0.69 ± 0.59 a	0.88 ± 0.85 a
5	20.10	Tetracosane	0.66 ± 0.63 a	0.47 ± 0.25 a
6	22.18	Eicosane	1.51 ± 1.11 a	1.21 ± 0.87 a
7	23.27	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	2.41 ± 3.23 a	1.14 ± 0.62 b
8	24.35	Hexacosane	0.85 ± 0.59 a	0.52 ± 0.25 b

9	26.47	Heptacosane	2.51 ± 2.03 a	1.90 ± 0.87 b
10	28.63	Octacosane	0.90 ± 0.71 a	0.76 ± 0.33 a
		2,6,10,14,18,22-Tetracosahexae		
11	29.29	ne,2,6,10,15, 19,23,-hexamethyl-, (all-E)-	4.01 ± 6.63 a	2.04 ± 3.05 a
12	32.78	Nonacasane	15.46 ± 8.42 a	13.455 ± 4.26 a
13	32.99	Triacontane (a)	4.71 ± 8.64 a	2.58 ± 4.25 a
14	35.66	Triacontane	19.82 ± 7.91 a	19.16 ± 8.17 a
15	40.60	Oxirane,heptadecyl-	12.23 ± 7.25 b	18.39 ± 8.94 a
16	42.88	Hexatriacontane	3.69 ± 2.39 a	5.05 ± 3.93 a
17	48.78	Z-12-Pentacosene	3.67 ± 4.06 a	1.74 ± 1.82 a
18	50.66	Oleyl Alcohol	22.54 ± 10.76 a	24.32 ± 5.69 a



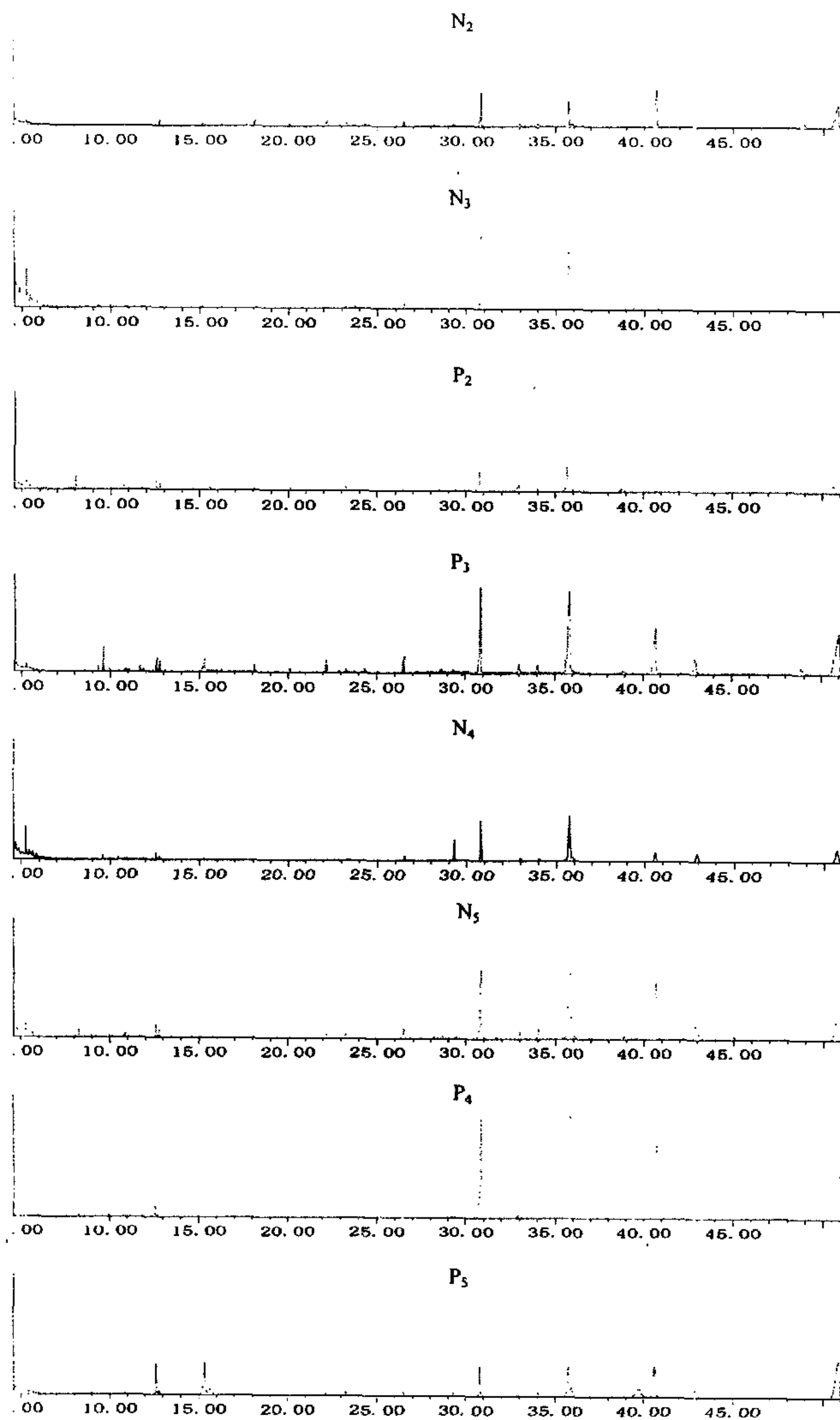


图 12-7 柑桔凤蝶蛹寄生后不同时间表皮碳氢化合物的气相色谱图

Fig. 12-7 The GC-MS total ionic chromatogram of cuticular hydrocarbon from *Papilio xuthus* after parasitization
by *Pteromalus puparum*

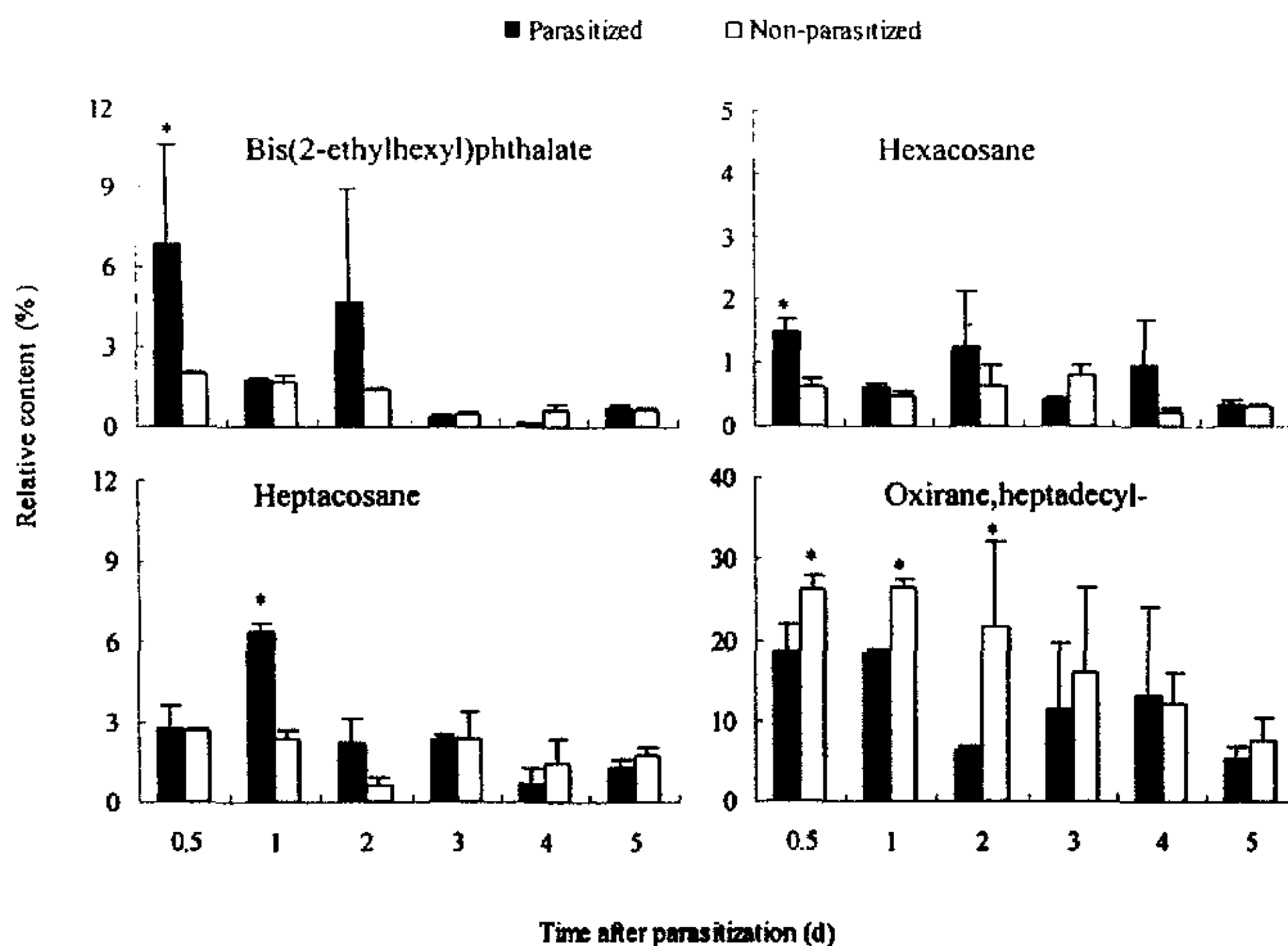


图 12-8 蝶蛹金小蜂寄生对柑桔凤蝶蛹表皮中 Bis(2-ethylhexyl)phthalate、Hexacosane、Heptacosane 和 Oxirane,heptadecyl-的影响

Fig. 12-8 Effect of parasitization on the relative content of Bis(2-ethylhexyl)phthalate、Hexacosane、Heptacosane and Oxirane,heptadecyl- from cuticle of *Papilio xuthus* pupae

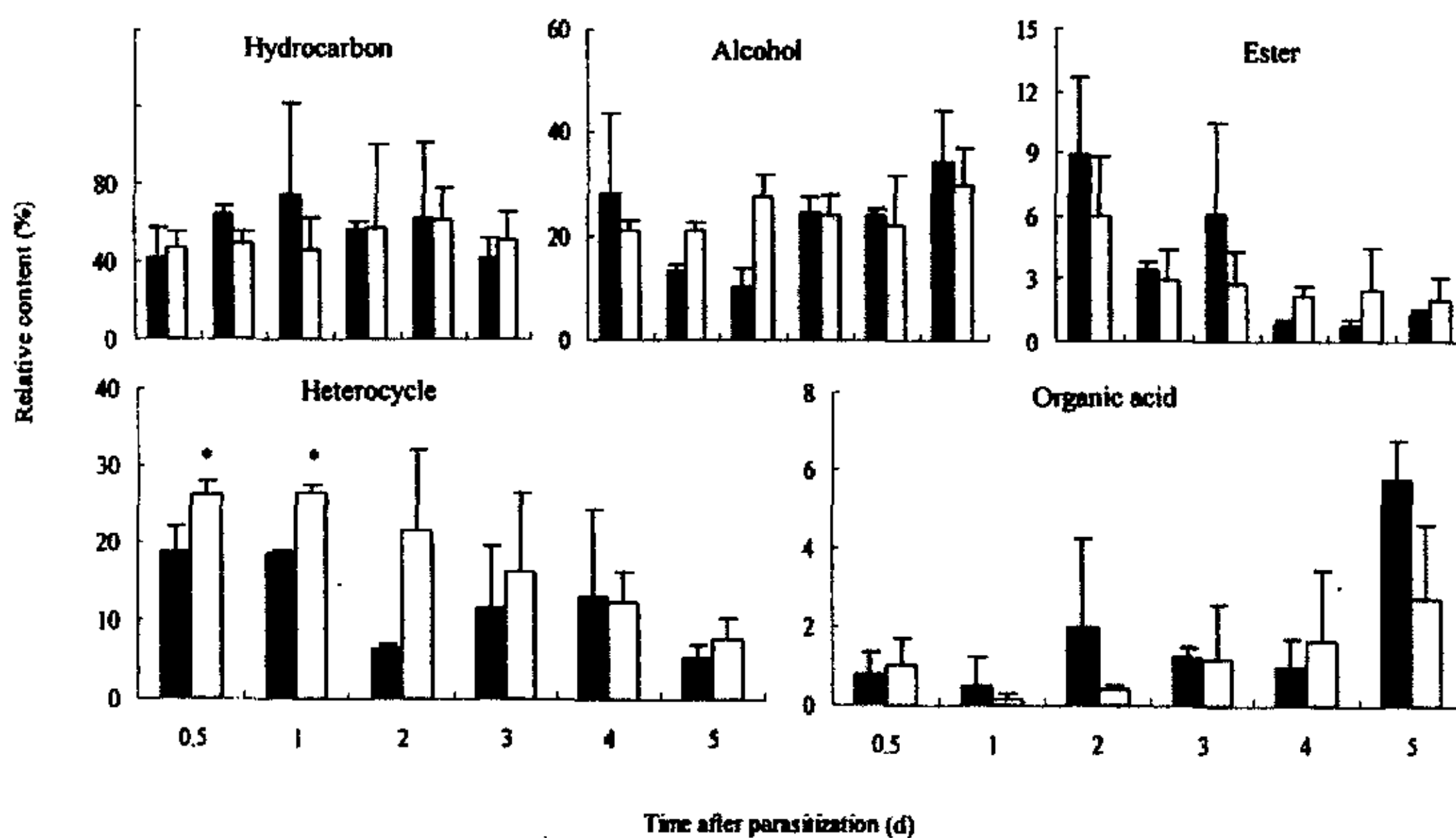


图 12-9 蝶蛹金小蜂寄生对柑桔凤蝶蛹表皮碳氢化合物相对含量的影响

Fig. 12-9 Effect of parasitization on the relative content of cuticular hydrocarbon from *Papilio xuthus* pupae

3 讨论

蝶蛹金小蜂的寄生或注射毒液对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹表皮蛋白的含量均无显著影响,但可引起菜粉蝶蛹表皮中可溶性蛋白的含量的显著下降和柑桔凤蝶蛹表皮中溶性蛋白的含量的显著升高(图 12-1 和 12-2)。对寄生蜂而言,寄主的表皮蛋白可能是难以利用的,而表皮中的可溶性蛋白则可能是可以利用的,故菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹被寄生或注射毒液后,表皮蛋白的含量并没有受到影响。菜粉蝶蛹表皮中可溶性蛋白可能被毒液激活的一些蛋白酶或蝶蛹金小蜂幼虫分泌物分解释放至血淋巴中,供幼蜂发育之利用,故表皮中可溶性蛋白含量于寄生或注射毒液后显著下降。由于柑桔凤蝶蛹相对较大,体内(血淋巴、脂肪体等)营养物质足够供应寄生蜂发育,故表皮中可溶性蛋白虽被分解,却没有释放到血淋巴中,故表皮中可溶性蛋白含量与对照相比显著升高。

寄主表皮中的脂类对于寄生蜂来说可能也是可以利用的。菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生后,表皮中脂类的含量与未寄生的对照蛹相比均显著下降,而注射毒液对其则无显著影响(图 12-3 和 12-4)。可能由于表皮中脂类供蝶蛹金小蜂幼虫发育之利用,故被寄生寄主表皮中脂类的含量均显著下降。

表皮碳氢化合物可作为种的分类特征或反映同一物种发育过程中的时间特征,故可以用于近缘物种的分类(Carlson *et al.*, 1999; Haverty & Nelsson, 1997; Locky, 1976)、物种的分型(Cuvillier-Hot *et al.*, 2001)或用于某一物种的年龄推断(Chen *et al.*, 1990; Densena *et al.*, 1999; 朱光辉, 2003),尤其在昆虫学研究上应用较多。而对于表皮碳氢化合物作为被寄生虫感染后组成的变化仅 Trabalon 等(2000)做过研究,而对于寄主被寄生蜂寄生后其表皮碳氢化合物组成的变化尚未有尝试,对此我们通过比较蝶蛹金小蜂两种寄主,菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生后表皮碳氢化合物的变化特征,得出以下结论:蝶蛹金小蜂的寄生对菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物的组成无显著影响(表 12-1, 图 12-5),而对柑桔凤蝶蛹表皮气相色谱图中峰 Bis(2-ethylhexyl)phthalate、Hexacosane、Heptacosane 和 Oxirane,heptadecyl-的相对含量有显著影响,就物质种类而言,杂环类化合物(17 烷基环氧乙烷)的含量于寄生后显著降低(表 12-2 和图 12-9)。这说明蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹表皮物质的变化无显著影响,但蝶蛹金小蜂的毒液也可抑制菜粉蝶蛹的羽化(第七章),这种发育的抑制作用可能体现在菜粉蝶蛹体内激素水平的变化。而蝶蛹金小蜂寄生对柑桔凤蝶蛹表皮中的几种碳氢化合物相对含量有显著影响,这此物质相对含量的变化一方面反映寄主昆虫的发育状况,内在原因可能与其体内激素水平有关,因而,受寄的菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹体内激素水平的变化(特别是蜕

皮激素) 及与寄生蜂幼蜂激素和发育的相互关系, 是值得深入研究的课题。昆虫表皮中可能还含有寄生蜂搜寻定位的信息化合物, 故通过对昆虫寄生前后表皮中有机溶剂提取物的分析, 可能找到抑制寄生蜂生寄生的产卵抑制化合物, 且我们已经通过 Y 型管试验证明, 蝶蛹金小蜂雌蜂更趋向于未受寄生的菜粉蝶蛹 (见附录 2)。而在本试验中, 表皮物质提取所用溶剂为非极性的正己烷, 在被寄生菜粉蝶表皮中未发现寄生特异性物质的出现, 由此可推测, 抑制蝶蛹金小蜂重寄生的信息化合物可能为极性物质, 因而可通过极性溶剂提取或使用固相微萃取的方法研究寄主被寄生后体表挥发物的变化, 对寄生标记物进行分离与鉴定。

第十三章 蝶蛹金小蜂毒液对寄主蛹血淋巴和脂肪体中蛋白质与脂类代谢的影响

在突破寄主的免疫系统后,寄生蜂可通过调节寄主体内营养及生理条件保证蜂卵的孵化及幼虫的正常发育(Beckage & Kanost, 1993; Thompson, 1993)。脂肪体是寄生蜂对寄主进行营养调控的主要靶标器官(Dong *et al.*, 1996; Shelby & Webb, 1994),寄生或注射毒液可引起寄主脂肪体代谢的改变(Nakamatsu *et al.*, 2001; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a, b; 2004; Richard & Edwards, 1999 b; Thompson, 2001)、抑制寄主贮藏蛋白的积累(Brandt *et al.*, 1996; Beckage & Kanost, 1993; Shelby & Webb, 1997; Zhang *et al.*, 1997)或促进其合成(Brandt *et al.*, 1996; Coudron *et al.*, 1997, 1998),而这种调控作用又可影响寄主血淋巴中蛋白质和脂类的代谢(Rivers & Denlinger, 1994; 1995; Rivers *et al.*, 2004)。为探明蝶蛹金小蜂对其两种寄主的营养调控,本章研究了蝶蛹金小蜂自然寄生和注射毒液对两种寄主血淋巴和脂肪体蛋白和脂类组成的影响,以明确蝶蛹金小蜂对寄主营养物质转运方向的调控作用,解释寄生蜂如何调控寄主营养物质的合成及代谢,并为幼蜂的发育提供合适的营养环境。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂、菜粉蝶及柑桔凤蝶的来源及饲养方法见第二章。

1.2 寄生及注射毒液

蝶蛹金小蜂对菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹的寄生、蝶蛹金小蜂毒液的提取参见第二章和第三章,毒液注射的方法见第七章。

1.3 蛋白质含量测定

1.3.1 血淋巴蛋白

取 100 μ l 寄生和注射毒液后 0.5, 2, 3, 4 和 5 d 的菜粉蝶蛹血淋巴, 1000 g 离心 10 min 以去除血细胞, 上清用于蛋白含量测定及电泳分析。蛋白定量采用 Bradford (1976) 的方法, 分别以同期未寄生和注射 TBS 的蛹血淋巴作对照, 每处理重复 3 头蛹, 以结晶牛血清白蛋白(BSA)做标准曲线。

1.3.2 脂肪体蛋白

取寄生后 0.5, 2, 3, 4 和 5 d 的菜粉蝶蛹脂肪体, 以 TBS 清洗 3 次后, 滤纸吸干水分, 称重、研磨后, 以 10000 g 离心 10 min, 上清即为脂肪体可溶性蛋白提取液, 测定方法同血淋巴蛋白含量的测定。

分别以寄生后 1、2 和 3 d 血淋巴 (去除血细胞) 和脂肪体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以同期未寄生蛹为对照, 电泳采用 Bio-Rad PROTEAN 3 cell 系统, 以不连续胶电泳, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4%, 5 mA 恒流至指示剂进入分离胶后, 以 10 mA 恒流至指示剂距胶底部约 1 cm 时结束电泳, 考马斯亮蓝 R 250 染色, 并拍照分析。

1.4 脂类含量测定

1.4.1 血淋巴脂类

参照 Nakamatsu & Tanaka (2003 a) 的方法。于寄生和注射毒液后 0.5, 2, 3, 4 和 5 d 分别取 5 μ l 菜粉蝶蛹血淋巴, 1000 g 离心 10 min, 上清以 100 μ l 氯仿, 抽提 5 min, 加入 0.5 ml 浓 H_2SO_4 , 沸水浴 10 min, 取出冷却至室温。加入 1 ml 芳草醛溶液 (13 mM 芳草醛溶于 14 M 磷酸中), 显色 30 min, 测 OD_{547} 。同时, 分别以同期未寄生和注射 TBS 的蛹血淋巴作对照, 每处理重复 3 头蛹, 以 2.5 mg/ml 胆固醇做标准曲线。

1.4.2 脂肪体脂类

取寄生和注射毒液后 0.5, 2, 3, 4 和 5 d 的菜粉蝶蛹脂肪体, 以 TBS 清洗 3 次后, 滤纸吸干水分, 称重, 以 0.5 ml 氯仿匀浆, 10000 g 离心 10 min, 取上清, 脂类含量的测定方法同 1.4.1。以同期未寄生和注射 TBS 蛹的脂肪体作对照, 每处理重复 3 头蛹。

2 结果

2.1 菜粉蝶蛹血淋巴及脂肪体中蛋白质与脂类

2.1.1 蛋白质

在不考虑处理后时间这一因子的前提下, 寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中蛋白含量无显著影响 ($F = 1.47, P = 0.23$), 注射毒液则可引起其血淋巴蛋白含量的显著升高 ($F = 7.59, P = 0.008$), 而寄生 ($F = 19.84, P = 0.0001$) 或注射毒液 ($F = 15.59, P = 0.0004$) 均可引起菜粉蝶蛹脂肪体蛋白含量的显著下降。

菜粉蝶蛹被寄生后 1 和 2 d 或注射毒液后 1~5 d, 血淋巴中的蛋白含量与未寄生对照相比显著升高 (图 13-1 A 和 B), 而于寄生或注射毒液后 1~5 d, 脂肪体中蛋白含量与未寄生或注射 TBS 的对照蛹相比均显著下降 (图 13-2 A 和 B)。

通过 SDS-PAGE 分析表明, 菜粉蝶蛹被寄生后 1~3 d 血淋巴电泳图谱中存在分子量约 95 和 23 kDa 蛋白, 而菜粉蝶蛹寄生后 1 d 及同期未寄生蛹的脂肪体蛋白电泳图谱中存在 95 kDa 蛋白, 而在 2 日龄后蛹脂肪体中消失, 说明此蛋白系菜粉蝶 1 和 2 日龄蛹发育所需, 而蝶蛹金小蜂幼虫发育过程中则不利用此蛋白。23 kDa 蛋白可能系菜粉蝶蛹发育过程中分解高分子量蛋白所致 (图 13-3)。

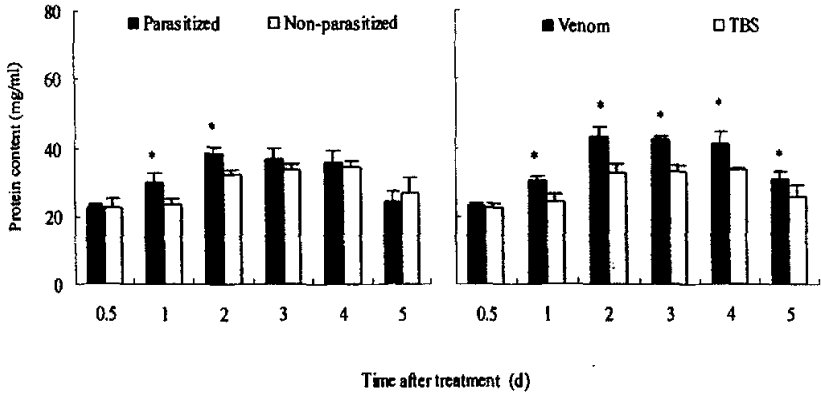


图 13-1 蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中蛋白含量的影响

Fig. 13-1 Effects of parasitization and venom injection on the titers of soluble proteins in *Pieris rapae* pupae

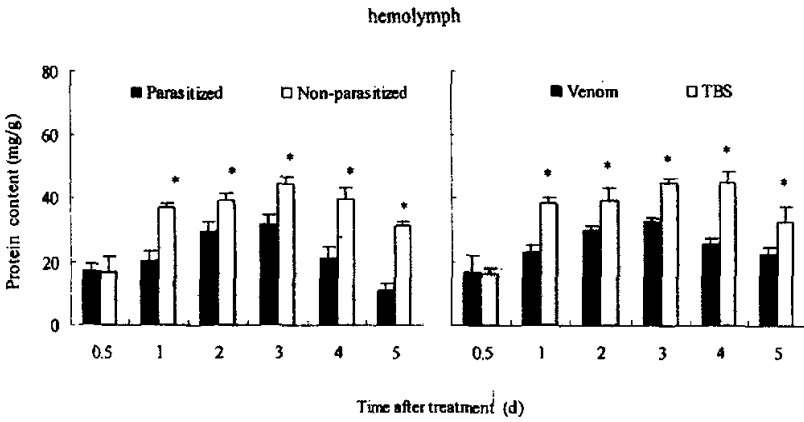


图 13-2 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹脂肪体中蛋白含量的影响

Fig. 13-2 Effects of parasitization and venom injection on the concentration of soluble protein in the fat body of

Pieris rapae pupae

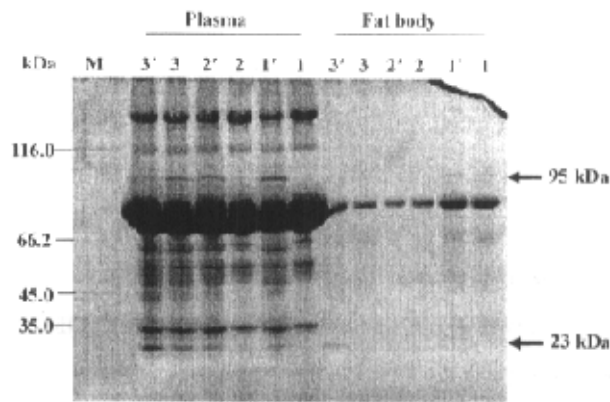


图13-3 寄生前后菜粉蝶蛹血淋巴和脂肪体蛋白的SDS-PAGE图谱

Fig. 13-3 SDS-PAGE profile of plasma and fat body proteins from parasitized and non-parasitized *Pieris rapae* pupae

1', 2', 3': 寄生后 1, 2 和 3 d 菜粉蝶蛹; 1, 2, 3: 同期未寄生菜粉蝶蛹; M: 蛋白标准分子量。1', 2', 3': Parasitized *Pieris rapae* pupae for 1, 2 and 3 days, respectively; 1, 2, 3: non-parasitized *Pieris rapae* pupae with day age of 1, 2 and 3 days; M: Protein marker.

2.1.2 脂类

在不考虑处理后时间这一因子时，蝶蛹金小蜂寄生 ($F = 8.86, P = 0.005$) 或注射毒液 ($F = 24.66, P < 10^{-4}$) 均可引起菜粉蝶蛹血淋巴中脂类含量的显著下降，而寄生 ($F = 2.63, P = 0.11$) 或注射毒液 ($F = 0.96, P = 0.33$) 对其脂肪体中脂类含量均无显著影响。

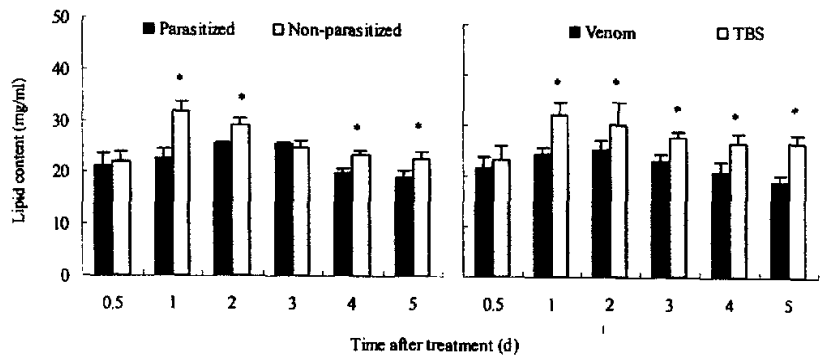


图 13-4 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中脂类含量的影响

Fig. 13-3 Effects of parasitization and venom injection on the titers of lipids in *Pieris rapae* pupae hemolymph

菜粉蝶蛹被寄生后 1, 2, 4 和 5 d 或注射毒液后 1~5 d, 血淋巴中脂类与未寄生或注射 TBS 的蛹相比均显著下降 (图 13-4), 而于寄生后 3 和 5 d 或注射毒液后 3 d, 脂肪体中脂类含量与未寄生或注射 TBS 的对照蛹相比显著下降 (图 13-5)。

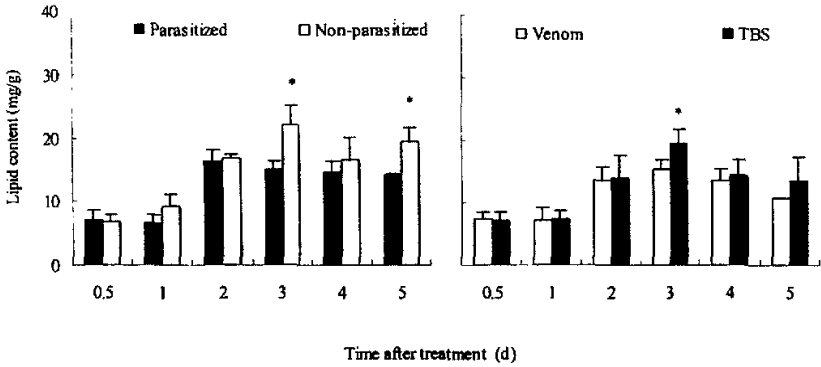


图 13-5 蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对菜粉蝶蛹脂肪体中脂类含量的影响

Fig. 13-4 Effects of parasitization and venom injection on the titers of lipid in *Pieris rapae* pupae fat body

2.2 柑桔凤蝶蛹血淋巴及脂肪体中蛋白质与脂类

2.2.1 蛋白质

在不考虑时间因子的情况下, 寄生对柑桔凤蝶蛹血淋巴可溶性蛋白含量无显著影响 ($F = 3.63, P = 0.07$), 而注射毒液则可引起柑桔凤蝶蛹血淋巴可溶性蛋白含量显著升高 ($F = 7.56, P = 0.01$), 寄生 ($F = 10.31, P = 0.003$) 或注射毒液 ($F = 10.62, P = 0.003$) 均可引起其脂肪体蛋白含量的显著下降。

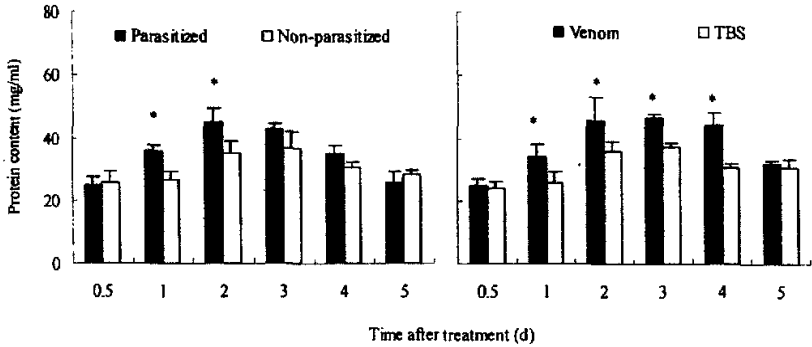


图 13-6 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹血淋巴蛋白含量的影响

Fig. 13-6 Effects of parasitization and venom injection on the titers of hemolymph proteins from *Papilio xuthus*

pupae

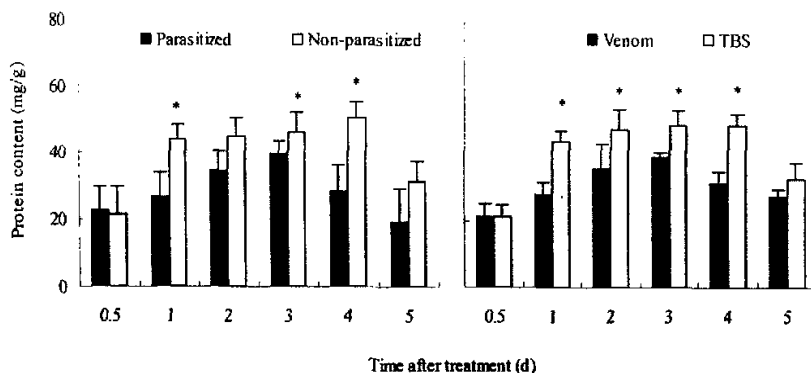


图 13-7 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹脂肪体蛋白含量的影响

 Fig. 13-7 Effects of parasitization and venom injection on the titers of fat body proteins from *Papilio xuthus* pupae

柑桔凤蝶蛹被寄生后 1~2 d 或注射毒液后 1~4 d, 血淋巴中可溶性蛋白含量与同期未寄生或注射 TBS 的对照蛹相比显著升高 (图 13-6), 而受寄后 1, 3, 4 d 或注射毒液后 1~4 d, 脂肪体中可溶性蛋白含量与同期未寄生或注射 TBS 的对照蛹相比均显著下降 (图 13-7)。

2.2.2 脂类

在不考虑时间因子的情况下, 蝶蛹金小蜂的寄生 ($F=4.78, P=0.04$) 或注射毒液 ($F=13.85, P=0.0007$) 均可使柑桔凤蝶蛹血淋巴中脂类含量显著下降, 寄生 ($F=0.96, P=0.34$) 或注射毒液 ($F=2.34, P=0.14$) 对其脂肪体脂类含量均无显著影响。

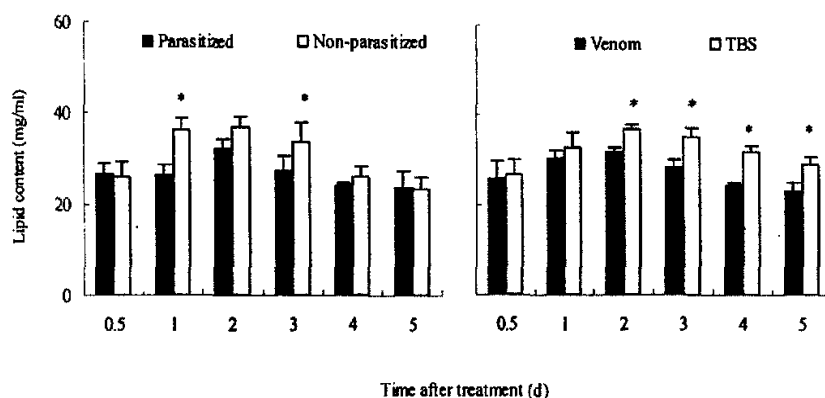


图 13-8 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹血淋巴脂类含量的影响

 Fig. 13-8 Effects of parasitization and venom injection on the titers of hemolymph lipids from *Papilio xuthus* pupae

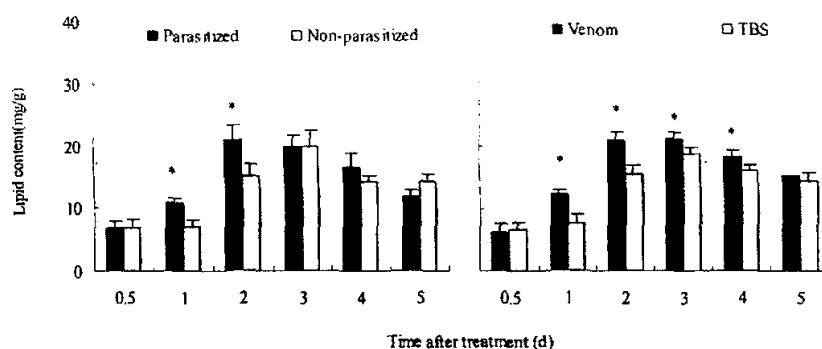


图 13-9 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹脂肪体脂类含量的影响

Fig. 13-9 Effects of parasitization and venom injection on the titers of fat body lipids from *Papilio xuthus* pupae

柑桔凤蝶蛹被寄生后 1 和 3 d 或注射毒液后 2~5 d, 血淋巴中脂类含量与同期未寄生或注射 TBS 的对照相比显著下降 (图 12-8), 柑桔凤蝶被蝶蛹金小蜂寄生后 1~2 d 和注射毒液后 1~4 d, 脂肪体中脂类与未寄生和注射 TBS 的对照相比均显著升高 (图 12-9)。

3 讨论

注射蝶蛹金小蜂毒液后, 菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹血淋巴中蛋白含量均显著升高和脂肪体蛋白含量的显著下降。因蝶蛹金小蜂毒液中乏广谱蛋白酶 (见第六章), 故蝶蛹金小蜂毒液可能促进了菜粉蝶蛹脂肪体内的蛋白水解路径, 从而使菜粉蝶蛹脂肪体内蛋白大量水解并释放到血淋巴中, 导致注射毒液后菜粉蝶蛹脂肪体内可溶性蛋白含量的下降及血淋巴中蛋白含量的升高。菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 血淋巴中可溶性蛋白含量并无显著变化, 而脂肪体内可溶性蛋白含量则显著下降, 概因被寄生菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹脂肪体内可蛋白分解释放至血淋巴内后被蝶蛹金小蜂幼虫利用, 因而出现菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生后血淋巴内可溶性蛋白含量与未寄生对照蛹相比无显著差异之现象。

蝶蛹金小蜂寄生菜粉蝶蛹后, 血淋巴中 95 kDa 蛋白由脂肪体合成, 并于化蛹后 2 d 左右释放至血淋巴中, 23 kDa 则系菜粉蝶蛹发育过程中分解高分子量蛋白所致 (图 13-3)。且被寄生菜粉蝶蛹血淋巴中未出现前人研究发现的寄生特异性蛋白 (Richards & Edwards, 1999; Reed & Brown, 1998)。

蝶蛹金小蜂的寄生或注射毒液引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中脂类含量的显著下降, 但又对脂肪体内脂类的含量无显著影响, 一方面是概因蝶蛹金小蜂幼虫发育可能首先利用了菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中的脂类, 另一方面, 也可能是蝶蛹金小蜂毒液可抑制菜粉

蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中物质向脂类转化的路径,这与第十一章中的蝶蛹金小蜂对菜粉蝶和柑桔凤蝶表皮脂类及表皮蛋白的利用情况研究结果相一致。Thompson 和 Bralow (1983)认为,寄生物为降低脂肪合成所需能量通过部分水解寄主脂类来完成。因而菜粉蝶蛹血淋巴中脂类可能是蝶蛹金小蜂最先利用的能源。

Rivers 和 Denlinger (1995)的研究表明,麻蝇 *Sarcophaga bullata* 预成虫被丽蝇蛹集金小蜂蛰刺 (Envenomated, 寄生后去除寄生蜂卵) 后,血淋巴脂类含量的下降和脂肪体脂类含量的升高, *Phormia regine* 血淋巴中脂类含量升高,而脂肪体中脂类含量下降,家蝇 *Musca domestica* 血淋巴中脂类含量变化不大,而脂肪体中脂类含量升高, *Sarcodexia stemodontus* 血淋巴和脂肪体中脂类含量均下降,而注射毒液对麻蝇 *Sarcophaga bullata* 可引起与蛰刺相似的生理效应,这一方面说明,不同寄生蜂对其寄主的营养调控均有其特异性,另方面也说明,同一种寄生蜂对不同寄主营养调控方式也有不同。Nakamatsu 和 Tanaka (2003 a) 的研究表明,粘虫 *Pseudaletia separate* 被姬小蜂 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 寄生后,血淋巴中蛋白和脂类含量显著升高,而脂肪体中二者含量在后期显著降低,注射 0.3 VRE 毒液可产生与寄生相似的生理效应,但注射毒液后寄主血淋巴中蛋白和脂类的含量与寄生相比升高,脂肪体内二者含量与寄生的相比无显著差异,这与我们的结果又有某些相似之处。而 Nakamatsu 和 Tanaka (2004) 进一步研究表明,东方粘虫 *P. separate* 血淋巴中脂类含量的升高是由姬小蜂 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 毒液引起脂肪体分解所致。

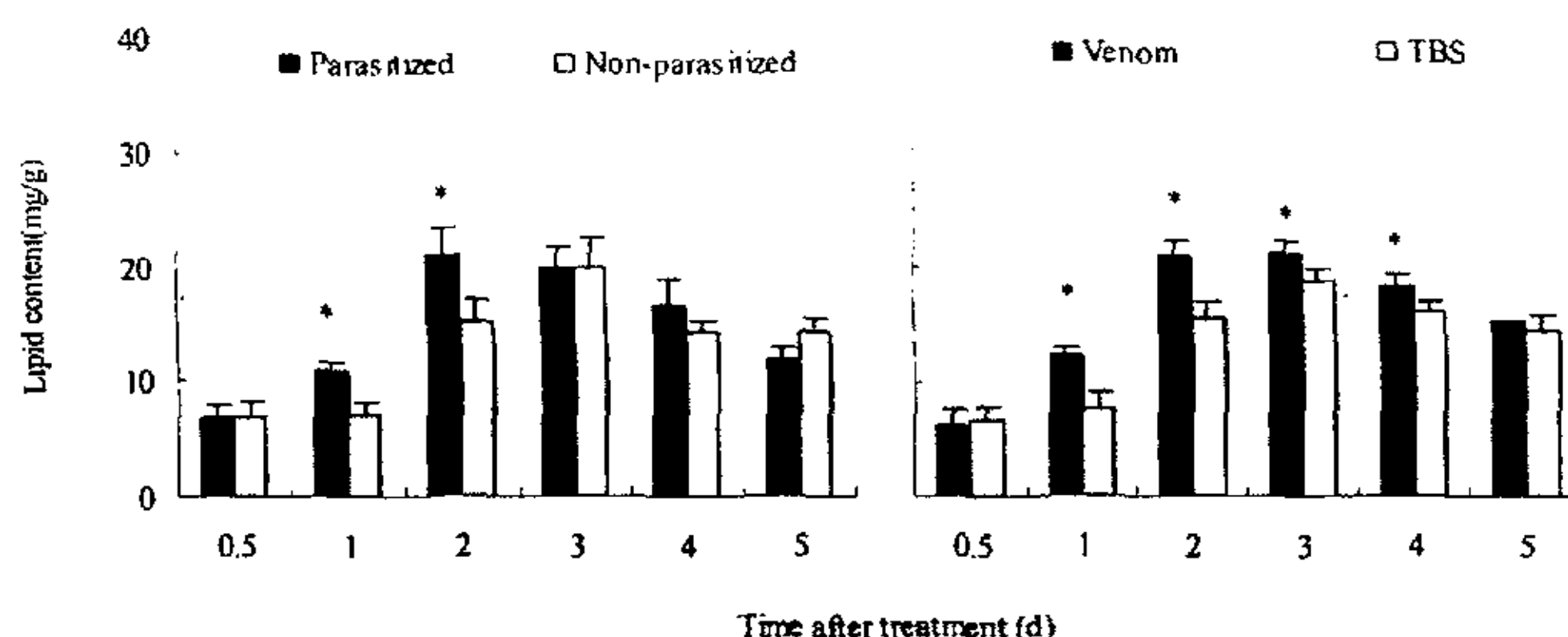


图 13-9 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对柑桔凤蝶蛹脂肪体脂类含量的影响

Fig. 13-9 Effects of parasitization and venom injection on the titers of fat body lipids from *Papilio xuthus* pupae

柑桔凤蝶蛹被寄生后 1 和 3 d 或注射毒液后 2~5 d, 血淋巴中脂类含量与同期未寄生或注射 TBS 的对照相比显著下降 (图 12-8), 柑桔凤蝶被蝶蛹金小蜂寄生后 1~2 d 和注射毒液后 1~4 d, 脂肪体中脂类与未寄生和注射 TBS 的对照相比均显著升高 (图 12-9)。

3 讨论

注射蝶蛹金小蜂毒液后, 菜粉蝶蛹和柑桔凤蝶蛹血淋巴中蛋白含量均显著升高和脂肪体蛋白含量的显著下降。因蝶蛹金小蜂毒液中乏广谱蛋白酶 (见第六章), 故蝶蛹金小蜂毒液可能促进了菜粉蝶蛹脂肪体内的蛋白水解路径, 从而使菜粉蝶蛹脂肪体内蛋白大量水解并释放到血淋巴中, 导致注射毒液后菜粉蝶蛹脂肪体内可溶性蛋白含量的下降及血淋巴中蛋白含量的升高。菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被蝶蛹金小蜂寄生后, 血淋巴中可溶性蛋白含量并无显著变化, 而脂肪体内可溶性蛋白含量则显著下降, 概因被寄生菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹脂肪体内可蛋白分解释放至血淋巴内后被蝶蛹金小蜂幼虫利用, 因而出现菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹被寄生后血淋巴内可溶性蛋白含量与未寄生对照蛹相比无显著差异之现象。

蝶蛹金小蜂寄生菜粉蝶蛹后, 血淋巴中 95 kDa 蛋白由脂肪体合成, 并于化蛹后 2 d 左右释放至血淋巴中, 23 kDa 则系菜粉蝶蛹发育过程中分解高分子量蛋白所致 (图 13-3)。且被寄生菜粉蝶蛹血淋巴中未出现前人研究发现的寄生特异性蛋白 (Richards & Edwards, 1999; Reed & Brown, 1998)。

蝶蛹金小蜂的寄生或注射毒液引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中脂类含量的显著下降, 但又对脂肪体内脂类的含量无显著影响, 一方面是概因蝶蛹金小蜂幼虫发育可能首先利用了菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中的脂类, 另一方面, 也可能是蝶蛹金小蜂毒液可抑制菜粉

蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中物质向脂类转化的路径,这与第十一章中的蝶蛹金小蜂对菜粉蝶和柑桔凤蝶表皮脂类及表皮蛋白的利用情况研究结果相一致。Thompson 和 Bralow (1983) 认为,寄生物为降低脂肪合成所需能量通过部分水解寄主脂类来完成。因而菜粉蝶蛹血淋巴中脂类可能是蝶蛹金小蜂最先利用的能源。

Rivers 和 Denlinger (1995) 的研究表明,麻蝇 *Sarcophaga bullata* 预成虫被丽蝇蛹集金小蜂螫刺 (Envenomated, 寄生后去除寄生蜂卵) 后,血淋巴脂类含量的下降和脂肪体脂类含量的升高, *Phormia regine* 血淋巴中脂类含量升高,而脂肪体中脂类含量下降,家蝇 *Musca domestica* 血淋巴中脂类含量变化不大,而脂肪体中脂类含量升高, *Sarcodexia stemodontus* 血淋巴和脂肪体中脂类含量均下降,而注射毒液对麻蝇 *Sarcophaga bullata* 可引起与螫刺相似的生理效应,这一方面说明,不同寄生蜂对其寄主的营养调控均有其特异性,另方面也说明,同一种寄生蜂对不同寄主营养调控方式也有不同。Nakamatsu 和 Tanaka (2003 a) 的研究表明,粘虫 *Pseudaletia separate* 被姬小蜂 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 寄生后,血淋巴中蛋白和脂类含量显著升高,而脂肪体中二者含量在后期显著降低,注射 0.3 VRE 毒液可产生与寄生相似的生理效应,但注射毒液后寄主血淋巴中蛋白和脂类的含量与寄生相比升高,脂肪体内二者含量与寄生的相比无显著差异,这与我们的结果又有某些相似之处。而 Nakamatsu 和 Tanaka (2004) 进一步研究表明,东方粘虫 *P. separate* 血淋巴中脂类含量的升高是由姬小蜂 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 毒液引起脂肪体分解所致。

第十四章 蝶蛹金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中氨基酸组成的影响

寄生蜂寄生可引起寄主血淋巴中游离氨基酸含量的升高, 如毁侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* 和索诺茧蜂 *Campoletis sonorensis* 对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的调节 (Vinson, 1990)、菜粉蝶绒茧蜂 *Cotesia glomerata* 对大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 的调节 (Junnikkala, 1966), 但黑头折脉茧蜂 *Cardiochiles nigriceps* 的寄生则可引起烟芽夜蛾 *H. virescens* 血淋巴中总氨基酸含量的下降或对其无显著影响 (Barras *et al.*, 1969; Vinson, 1990)。烟芽夜蛾 *H. virescens* 被 *Toxoneuron nigriceps* 寄生后 16~28 h, 血淋巴中氨基酸含量升高, 就氨基酸种类来说, 甘氨酸、丝氨酸、组氨酸、天冬氨酸和脯氨酸含量均显著升高, 苏氨酸和酪氨酸含量显著下降 (Consoli & Vinson, 2004)。Rahbé 等 (2002) 研究表明, 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 被蚜茧蜂 *Aphidius ervi* 寄生后 4 d 血淋巴中游离氨基酸总含量显著升高, 且寄生对酪氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、天冬氨酸、精氨酸和色氨酸等氨基酸的含量影响显著。研究昆虫被寄生后血淋巴中氨基酸含量和组成的变化, 对明确寄生蜂对寄主的生理效应和寄生蜂的离体培养均有极重要意义。为此, 本章研究了蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中氨基酸含量和组成的影响, 以明确此毒液在对寄主进行营养调控中的作用, 为蝶蛹金小蜂的离体大规模培养并用于生物防治提供营养学基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂和菜粉蝶饲养及寄生和注射的方法见第二章和第七章。

1.2 取样方法

取寄生或注射毒液后 0.5, 1, 2, 3, 4 d 的菜粉蝶蛹, 解剖针刺破表皮后, 以微量移液枪吸取流出的血淋巴, 4℃ 1000 g 离心 10 min, 取上清, -70℃ 保存或立即用于试验, 并以同期未寄生或注射 TBS 的蛹作对照。

1.3 氨基酸含量的测定方法

氨基酸含量的测定采用 Agilent 1100 (Agilent, USA) 液相色谱分析仪, 色谱柱为 20 RBAX Eclipse AAA, 激发波长为 340 nm, 测定波长为 450 nm, 以含量均为 90 pmol/μl 的氨基酸

做标准图谱，以确定待测样品中各种氨基酸的含量。

2 结果

菜粉蝶蛹血淋巴中不含有谷氨酰氨和色氨酸，甲硫氨酸含量较低（表 14-1, 14-2），就氨基酸种类来说，以脂肪族氨基酸为主，约占总氨基酸含量的 80%（图 14-1 和 14-2）。

蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸含量均无显著影响（表 14-1 和 14-2）。寄生可引起菜粉蝶蛹血淋巴总氨基酸含量（ $F = 8.52, P < 10^{-4}$ ）的显著下降，而注射毒液对此则无显著影（ $F = 4.15, P = 0.06$ ）（表 14-1 和图 14-1）。

就氨基酸类别来说，蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸（ $F = 4.30, P = 0.06$ ）和杂环族氨基酸（ $F = 0.22, P = 0.65$ ）含量均无显著影响，但可引起脂肪族氨基酸含量的显著下降（ $F = 18.30, P = 0.0001$ ）（图 14-2）。注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸（ $F = 0.69, P = 0.43$ ）、脂肪族氨基酸（ $F = 2.69, P = 0.11$ ）和杂环族氨基酸（ $F = 2.52, P = 0.15$ ）的相对含量均无显著影响（图 14-2）。

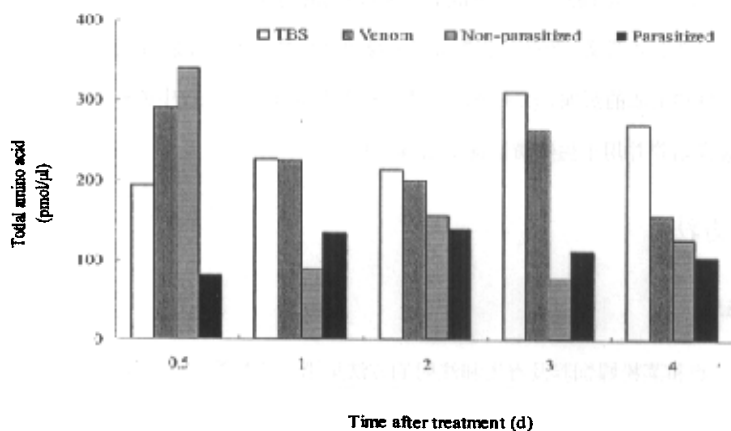


图 14-1 蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中氨基酸总含量的影响

Fig. 14-1 Effects of parasitization and venom injection on the total amino acid titers in hemolymph of *Pieris rapae* pupae

日龄对菜粉蝶未寄生蛹（ $F = 22.85, P < 10^{-4}$ ）、寄生蛹（ $F = 12.16, P < 10^{-4}$ ）、注射毒液蛹（ $F = 40.09, P < 10^{-4}$ ）和注射TBS蛹（ $F = 9.88, P < 10^{-4}$ ）血淋巴中总氨基酸含量均有显著影响，而对各种氨基酸含量均无显著影响（表 14-1, 14-2）。日龄对菜粉蝶未寄生蛹（ $F = 11.11, P = 0.007$ ）、寄生蛹（ $F = 48.93, P = 0.001$ ）、注射毒液蛹（ $F = 6.81, P = 0.04$ ）和注射TBS蛹（ $F = 17.62, P = 0.008$ ）血淋巴中芳香族氨基酸含量均有显著影响；对未寄生蛹（ F

= 48.79, $P = 0.001$)、注射毒液蛹 ($F = 6.82, P = 0.04$) 和注射TBS蛹 ($F = 8.35, P = 0.03$) 血淋巴中杂环族氨基酸含量也有显著影响, 而对寄生蛹 ($F = 2.66, P = 0.18$) 血淋巴中杂环族氨基酸含量无显著影响; 对未寄生蛹 ($F = 18.43, P < 10^{-4}$)、寄生蛹 ($F = 11.13, P < 10^{-4}$)、注射毒液蛹 ($F = 30.89, P < 10^{-4}$) 和注射TBS蛹 ($F = 7.78, P < 10^{-4}$) 血淋巴中脂肪族氨基酸含量均有显著影响。

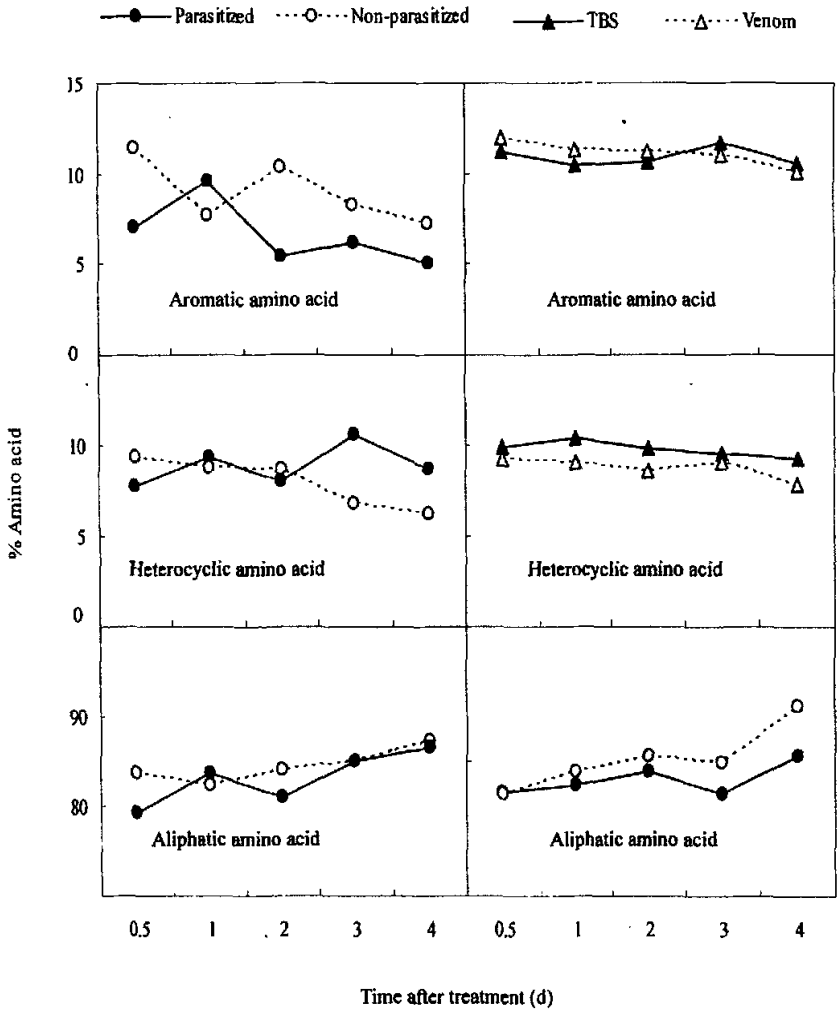


图 14-2 寄生注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中三类氨基酸相对含量的影响

Fig. 14-2 Effects of parasitization and venom injection on relative contents of 3 kinds of amino acid in hemolymph of *Pieris rapae* pupae

表 14-1 寄生对菜粉蝶蛹血淋巴氨基酸种类及相对含量的影响

Table 14-1 Changes of total amino acid content in hemolymph of *Pieris rapae* pupae after parasitized by *Pteromalus puparum* venom

No.	Amino acid	Concentration of amino acid (pmol/ μ l)										Parasitism effect	Age effect
		P _{0.5}	N _{0.5}	P ₁	N ₁	P ₂	N ₂	P ₃	N ₃	P ₄	N ₄		
1	D	5.26	34.22	12.41	6.00	9.57	13.53	7.48	4.52	6.32	11.32	F=1.73, P=0.26	F=0.55, P=0.71
2	E	6.62	29.97	11.48	6.89	10.26	13.14	9.64	5.76	7.90	9.58	F=1.40, P=0.30	F=0.56, P=0.70
3	N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.26	0.00	4.68	5.39	F=0.63, P=0.47	F=4.85, P=0.08
4	S	3.54	21.62	5.95	3.50	5.26	6.60	5.23	2.98	4.35	5.16	F=1.22, P=0.33	F=0.72, P=0.62
5	Q	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
6	H	2.91	13.46	4.58	2.80	4.23	4.82	3.63	2.36	2.11	2.61	F=1.34, P=0.31	F=0.88, P=0.55
7	G	4.34	26.56	7.54	4.62	5.76	7.90	5.66	5.22	5.25	5.54	F=0.98, P=0.38	F=0.71, P=0.62
8	T	2.73	14.26	5.31	2.92	3.99	5.50	3.34	1.82	2.87	4.11	F=1.56, P=0.28	F=0.66, P=0.65
9	R	2.90	13.71	5.15	3.08	4.44	5.55	3.72	2.32	2.77	3.70	F=1.55, P=0.28	F=0.69, P=0.64
10	A	4.59	19.09	7.77	4.14	5.98	7.08	5.89	4.06	5.79	5.94	F=0.82, P=0.41	F=0.60, P=0.68
11	Y	2.85	23.15	7.05	3.60	6.75	9.02	3.66	2.20	2.59	4.71	F=2.10, P=0.22	F=0.68, P=0.64
12	C	21.85	21.15	22.21	25.57	48.47	31.44	29.10	20.20	32.56	32.99	F=3.18, P=0.15	F=2.82, P=0.17
13	V	5.30	25.14	10.52	5.80	8.11	11.32	7.68	5.06	7.48	8.90	F=1.24, P=0.33	F=0.46, P=0.76
14	M	0.00	3.98	0.00	0.00	1.59	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00	F=3.79, P=0.12	F=1.00, P=0.50
15	W	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
16	F	2.87	15.63	5.86	3.14	4.90	7.04	3.33	1.67	2.62	4.45	F=2.11, P=0.22	F=0.64, P=0.66
17	I	3.26	13.60	5.99	3.39	4.24	5.95	3.65	2.31	3.05	4.32	F=1.50, P=0.29	F=0.66, P=0.65
18	L	3.74	22.09	8.14	3.85	5.31	8.09	4.88	2.86	4.01	5.90	F=1.29, P=0.32	F=0.63, P=0.67
19	K	3.82	23.32	8.15	3.94	6.29	8.24	5.40	3.16	4.10	6.61	F=1.42, P=0.30	F=0.62, P=0.67
20	P	4.69	18.24	6.22	4.94	5.30	8.67	6.20	5.26	5.93	5.25	F=1.01, P=0.37	F=0.64, P=0.66
Total acid amino		339.19	81.27	88.19	134.32	71.76	155.41	140.44	112.77	126.60	104.39	F=48.52, P<10 ⁻⁴	F=0.54, P=0.72

注: P_{0.5}~N₄: 寄生后 0.5~4 d 菜粉蝶蛹, N_{0.5}~N₄: 0.5~4 日龄菜粉蝶未寄生蛹。P_{0.5}~P₄: *Pieris rapae* pupae parasitized for 0.5 to 4 days; N_{0.5}~N₄: 0.5 to 4 day-aged non-parasitized *Pieris rapae* pupae.

表 14-2 注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴氨基酸种类及相对含量的影响
Table 14-2 Changes of total amino acid content in hemolymph of *Pieris rapae* pupae after injected with *Pteromalus puparum* venom

序号 No.	Amino acid	Concentration of amino acid (pmol/ μ l)										Venom effect	Age effect
		$V_{0.5}$	$T_{0.5}$	V_1	T_1	V_2	T_2	V_3	T_3	V_4	T_4		
1	D	29.96	21.15	24.27	25.05	21.41	23.43	27.14	34.56	16.77	25.03	$F=0.40, P=0.56$	$F=1.24, P=0.42$
2	E	29.45	20.98	22.11	23.12	19.25	19.81	27.64	31.45	15.93	23.46	$F=0.11, P=0.76$	$F=2.00, P=0.26$
3	N	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
4	S	20.67	14.32	16.68	17.07	15.28	14.48	18.10	21.87	12.60	19.68	$F=0.13, P=0.73$	$F=0.56, P=0.70$
5	Q	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
6	H	11.38	7.61	8.70	8.33	7.17	6.96	10.59	10.80	6.74	7.92	$F=0.50, P=0.52$	$F=2.60, P=0.19$
7	G	26.68	16.90	22.77	19.75	20.71	18.58	23.26	25.36	16.38	20.34	$F=0.55, P=0.50$	$F=0.72, P=0.62$
8	T	12.15	8.28	9.79	10.31	8.74	10.44	11.47	14.04	6.75	10.67	$F=0.53, P=0.51$	$F=1.03, P=0.49$
9	R	11.27	7.93	7.61	9.42	7.12	9.63	10.61	13.04	5.68	9.68	$F=1.39, P=0.30$	$F=1.33, P=0.40$
10	A	19.76	12.80	14.10	14.61	12.73	16.39	17.09	21.20	10.01	16.43	$F=0.44, P=0.54$	$F=0.79, P=0.59$
11	Y	20.33	14.16	13.44	14.41	12.09	13.34	18.56	18.43	9.36	14.96	$F=0.03, P=0.88$	$F=1.77, P=0.30$
12	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.61	$F=1.00, P=0.37$	$F=1.00, P=0.50$
13	V	22.04	17.56	17.69	20.38	16.93	20.23	21.67	29.66	14.41	24.02	$F=2.41, P=0.20$	$F=1.14, P=0.45$
14	M	3.51	0.00	2.65	0.00	0.00	0.00	4.24	0.00	0.00	3.52	$F=0.94, P=0.39$	$F=0.27, P=0.88$
15	W	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—
16	F	13.14	8.94	10.14	11.15	9.01	10.43	12.11	15.69	7.15	12.23	$F=1.26, P=0.32$	$F=1.22, P=0.43$
17	I	11.49	7.75	9.43	9.64	8.37	9.29	11.11	12.87	6.50	9.53	$F=0.15, P=0.72$	$F=1.34, P=0.39$
18	L	19.14	12.97	15.08	16.14	13.56	15.70	17.78	22.30	10.58	16.54	$F=0.51, P=0.52$	$F=1.10, P=0.46$
19	K	21.80	11.59	15.67	14.41	14.32	12.59	17.01	20.62	9.55	14.11	$F=0.15, P=0.72$	$F=0.86, P=0.55$
20	P	17.22	10.27	14.68	12.23	12.33	11.40	14.56	17.10	7.66	13.29	$F=0.04, P=0.85$	$F=0.71, P=0.63$
Total amino acid		193.20	289.01	226.02	224.92	212.72	199.02	309.01	262.92	270.02	156.08	$F=4.15, P=0.06$	$F=0.70, P=0.63$

注: $V_{0.5} \sim V_4$: 注射毒液后 0.5 ~ 4 d 菜粉蝶蛹; $T_{0.5} \sim T_4$: 注射 TBS 后 0.5 ~ 4 d 菜粉蝶蛹。 $V_{0.5} \sim V_4$: *Pieris rapae* pupae injected with venom for 0.5 to 4 days; $T_{0.5} \sim T_4$: *Pieris rapae* pupae injected with TBS for 0.5 to 4 days.

3 讨论

蝶蛹金小蜂寄生和注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸含量均无显著影响。寄生可引起总氨基酸含量的显著下降,注射毒液对此则无显著影响,说明蝶蛹金小蜂发育过程中可能直接利用了菜粉蝶蛹血淋巴中氨基酸。寄生对血淋巴中芳香族和杂环族氨基酸含量无显著影响,但可显著降低脂肪族氨基酸含量,注射毒液对三类氨基酸的含量均无显著影响,说明蝶蛹金小蜂幼虫在合成蛋白过程中对寄主血淋巴中游离的脂肪族氨基酸的利用有一定的偏好性,因此在对此寄生蜂进行离体大规模培养时,人工饲料中可适当增加脂肪族氨基酸含量,以满足其发育的需要。菜粉蝶蛹日龄对未寄生、注射毒液和注射TBS的菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸、杂环族氨基酸及总氨基酸含量均有显著影响,对寄生蛹血淋巴中芳香族和脂肪族氨基酸含量也有显著影响,而对寄生蛹血淋巴中杂环族氨基酸含量无显著影响,说明各种处理的菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族和脂肪族氨基酸的合成及代谢均有其时间特征,蝶蛹金小蜂的寄生可抑制这种菜粉蝶蛹血淋巴中杂环族氨基酸的合成与代谢,使之维持于某一水平。

尽管氨基酸对寄生蜂幼虫发育至关重要,但对寄生蜂幼虫进行离体大规模培养时,激素特别是20-羟蜕皮酮也起着极其重要的作用(Thompson, 1986; 1999; Nakahara *et al.*, 1999)。因而,菜粉蝶蛹被寄生后其血淋巴中氨基酸含量的变化,仅反映蝶蛹金小蜂幼虫对其营养的利用,而对其激素特别是蜕皮激素的利用可能也是值得探讨的科学问题。

第三部分 总 讨 论

总讨论

寄生蜂和寄主关系一直是昆虫生理学研究的热点, 近年来, 权威刊物上的文章也是层出不穷 (Hayakawa, 1990; 1991; 1994; Aizawa *et al.*, 1999; Glatz *et al.*, 2003; Hayakawa & Kawano, 2003; Oliver *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2005)。就研究对象来说, 一般限于对某一种寄生蜂抑制寄主免疫或对寄主进行营养和发育的调控作用研究, 描述某种调控因子的作用。研究水平则深浅不一, 从生物学到生理生化及分子水平均有涉及 (Parkinson *et al.*, 2002; Rivers *et al.*, 2002; Villagra *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Rivers, 2004; Zhang *et al.*, 2004)。相对而言, 对两种或多种寄生蜂毒液生化特性和生理功能比较的研究资料还相对匮乏 (Russo *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2003; Rivers, 2004)。故我们选取两种不同寄生类型寄生蜂为研究模式, 通过比较毒液生化特性和生理功能, 更深入了解寄生蜂与寄主关系及寄生蜂毒液在对寄主进行生理调控中的作用。

1 寄生蜂抑制寄主免疫的策略

寄生蜂对寄主进行生理调控的因子主要有毒液, 多分DNA病毒及病毒样颗粒, 卵巢蛋白, 卵表物质寄生蜂胚胎发育过程中产生的畸形细胞及寄生蜂幼虫分泌物等 (Asgari & Schmidt, 1994; Jones, 1996; Luckhart & Webb, 1996; Beckage, 1998; Vinson *et al.*, 1998; 叶恭银和胡萃, 1998; Hochuli *et al.*, 1999; Kinuthia *et al.*, 1999; Shelby & Webb, 1999; 尹丽红, 2001; Rivers *et al.*, 2002)。本论文通过对蝶蛹金小蜂雌雄蜂生殖系统各部分提取物对其寄主血细胞的形态、存活及行为的影响表明, 雌蜂毒液是抑制寄主血细胞免疫的主要因子, 且无多分DNA病毒、病毒样颗粒等其它雌蜂携带因子及胚胎发育过程中产生的畸形细胞的协同作用 (Cai *et al.*, 2004)。这与丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 抑制寄主免疫的因子大致相同。故本论文的工作主要围绕蝶蛹金小蜂毒液展开, 并与丽蝇蛹集金小蜂毒液作对比, 通过二者的比较, 明确寄生蜂毒液对寄主昆虫和非寄主昆虫在免疫和营养两个方面调控的异同及同一昆虫对自然寄生蜂和非自然寄生蜂调控因子的反应, 从而揭示寄生蜂毒液对寄主进行生理调控的功能, 并阐明毒液在寄生蜂与寄主协同进化中的作用。

寄生蜂毒液单独或与其它雌蜂携带因子一起, 对寄主血淋巴酶氧化酶活性、血淋巴黑化作用、血细胞数量、延展、存活及包裹反应均有抑制作用 (Asgari *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Parkinson *et al.*, 2002; Richards & Edward, 1999 a, b; 2000 a, b; Willers & Lehmann-Danzinger, 1984; Zhang *et al.*, 2004)。蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液使菜粉蝶蛹血细胞数量显著升高、浆血细胞所占比例显著下降、颗粒血细胞比例显著升高, 而注射丽蝇蛹集金小蜂毒液则无此现象, 说明寄生蜂毒液有一定的作用范围。进一步通过离体和活体研究毒液的功能表明, 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制活体菜粉蝶幼虫和蛹浆血细胞和颗粒血细胞的延展、存活及包裹作用, 高浓度 (> 0.016 VRE/ μ l) 丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶 5 龄幼虫和蛹血细胞的延展仅

有部分作用，而对血细胞的存活和包囊作用则无影响。

蝶蛹金小蜂毒液一方面导致菜粉蝶体内血细胞总数的增加，而血细胞的数量与其包囊能力成正比，理论上讲，寄生后活体菜粉蝶血细胞对 Sephadex A-50 珠的包囊能力应强于未寄生菜粉蝶蛹，而另一方面毒液又可抑制菜粉蝶蛹血细胞的延展和包囊能力，且毒液并未破坏菜粉蝶蛹血细胞的细胞骨架 (Cai *et al.*, 2004)，说明毒液可能破坏了寄主体内血细胞延展肽的转录或表达 (Clark *et al.*, 1997, 2001, 2004) 或阻断了寄主血细胞或血淋巴中的识别因子的信号传导，抑制了寄主血细胞的正常延展及对异物的识别。毒液一方面诱导菜粉蝶蛹血细胞数量的增加，另一方面又可引起菜粉蝶蛹血细胞的显著死亡，这又是一对矛盾，毒液可能刺激菜粉蝶造血功能的增强，其意义何在？可通过研究蝶蛹金小蜂毒液对离体培养的寄主造血器官的造血功能的影响，再做定论。蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞中酚氧化酶活性、血淋巴黑化作用均无显著抑制。产于菜粉蝶蛹内的蝶蛹金小蜂卵之所以未被寄主血淋巴黑化，可能由于卵表物质通过“分子拟态”逃避了寄主血淋巴中识别因子的识别，从而使蜂卵逃避寄主的体液免疫，并在寄主体内成功发育。

2 寄生蜂毒器官发育及其与卵子发育的协调性

寄生蜂的毒器官发育像卵子发育一样受营养条件的限制。本论文研究表明，喂食蜂蜜对蝶蛹金小蜂毒器官发育可产生显著有益影响，而交配对其则无显著影响，说明毒器官的发育主要受食料的影响。在无食料的情况下，交配时，雄蜂来源的物质不能为寄生蜂雌蜂毒器官的发育提供足够营养。

寄生蜂产卵过程中，卵与毒液及其它雌蜂因子同时注入寄主体内，故寄生蜂毒器官发育可能与卵子的发育存在一定的相关关系。喂食蜂蜜且正常交配的蝶蛹金小蜂毒腺长度、毒囊直径及毒液蛋白含量与其卵巢中成熟卵数量成正相关，而与卵巢中 I 级卵和 II 级卵数量成负相关，说明蝶蛹金小蜂毒器官发育与卵子的成熟是一致的，这对提高寄生率和寄生蜂卵的发育均是有益的。丽蝇蛹集金小蜂毒器官各组成部分发育与卵巢中成熟卵与未成熟卵数量均不存在此相关性。这种差异可能与两种寄生蜂的寄生类型有关，丽蝇蛹集金小蜂属外寄生蜂，产卵于蝇类围蛹内表皮之上，寄生蜂卵不受寄主免疫系统直接作用，故毒器官发育与卵子发育不一致。而蝶蛹金小蜂属内寄生蜂，产卵于寄主血腔中，蜂卵直接面对寄主免疫系统的作用，毒器官发育与卵子发育的一致性对抑制寄主免疫系统对蜂卵的作用，提高寄生率是有益的。两种金小蜂毒器官各组成部分之间的发育存在一定的相关性，说明毒器官的发育由其规律性和协调性。

3 寄生蜂毒液蛋白组成及生化特性

蝶蛹金小蜂毒液蛋白有 7 条带的自然分子量大于 100 kDa，且表达量最高的 3 个蛋白分子量均大于 100 kD。丽蝇蛹集金小蜂蛋白自然状态下由 9 条带组成，表达量最高的蛋白为 246.20 kDa。蝶蛹金小蜂毒液中有活性组分是大于 100 kDa 的蛋白组分，属大分子蛋白，这

与膜翅目社会性昆虫毒液中活性组分多为低分子蛋白或小肽有所不同。瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液对昆虫细胞系 SF21 有毒性的组分为小于 13 kDa 蛋白, 抑制寄主血细胞聚集和包裹作用的活性因子为 28 和 32 kDa 蛋白 (Parkinson *et al.*, 2002), 说明不同寄生蜂毒液中毒性因子因种而异。其中蝶蛹金小蜂毒液中引起细胞延展和死亡的因子系一种蛋白或是一组蛋白? 对寄主血细胞有活性的蛋白组分与对两种细胞系有作用的组分是否相同? 都值得做进一步研究。

SDS-PAGE 分析表明, 蝶蛹金小蜂毒液蛋白分子量主要集中于 21.17 ~ 44.41 kDa, 丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白分子量主要集中于 21.15 ~ 36.68 kDa。且通过与已经研究的寄生蜂毒液的组分相比, 不同种间的差异太大 (Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; Coudron *et al.*, 2000), 很难做有意义的比较。

蝶蛹金小蜂毒液蛋白等电点集中于 4 ~ 7 之间, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白等电点为 5 ~ 10。对蝶蛹金小蜂毒液双向电泳胶内表达量较高的 7 个点进行 MALDI-TOF 质谱分析, 并以 UCSF 的 MS-FTT 查询表明, 此 7 种蛋白与数据库中所有蛋白匹配率均不高, 最高仅为 34%。说明此类数据较缺乏, 且所查数据也仅集中于东亚飞蝗 *Locusta migratoria*、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*、美洲大蠊 *Periplaneta americana*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等几种昆虫, 说明昆虫蛋白组学研究的相对滞后。

两种金小蜂毒液的生理活性受外界环境的影响, 当以 50℃ 处理 10 min, 蝶蛹金小蜂毒液生理活性基本不受影响, 而此时丽蝇蛹集金小蜂毒液的活性则受到部分影响, 说明蝶蛹金小蜂毒液的热稳定性要好于丽蝇蛹集金小蜂毒液。当缓冲液 pH 值在 5 ~ 8 之间时, 蝶蛹金小蜂毒液具有正常生理活性, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液作用的最适 pH 值为 6.7 ~ 8, 在中性条件下, 二者均可保持较高的生理活性, 因此在收集两种金小蜂毒液时, 提取缓冲液最好为中性。而菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴 pH 值均约为 6 ~ 7, 故可保证蝶蛹金小蜂毒液保持正常的生理活性。棕尾别麻蝇及家蝇蛹血淋巴 pH 值约为 7.5, 也可保证丽蝇蛹集金小蜂毒液的正常生理功能。

两种金小蜂毒液正己烷提取物的水相有生理活性而有机相无生理活性, 说明毒液有生理活性的部分是蛋白而非脂类或其它, 氯仿: 乙醇提取液则可能因引起蛋白变性而使毒液活性丧失。表面活性剂对两种金小蜂毒液功能无影响, 故分离活性组分时, 可先以表面活性剂去除一些杂蛋白, 为分离纯化简化步骤。两种金小蜂毒液对胰蛋白酶则比较敏感, 1 mg/ml 胰蛋白酶处理 10 min 后, 两种金小蜂毒液的生理活性均完全丧失; 1 mg/ml 的蛋白酶 K 仅使丽蝇蛹集金小蜂毒液活性部分丧失, 而对蝶蛹金小蜂毒液生理活性无影响, 胰蛋白酶专一性强、只断裂赖氨酸、精氨酸的羧基参与形成的肽键, 故两种金小蜂有活性的蛋白组分中赖氨酸或精氨酸可能较高。蛋白酶 K 的作用位点是丝氨酸位点, 故在蝶蛹金小蜂毒液中活性组分中不含丝氨酸或含量较少, 而丽蝇蛹集金小蜂毒液活性组分中丝氨酸含量较高, 也可能与处理时间有关, 若处理时间延长, 蛋白酶 K 也可能对两种金小蜂毒液的活性产生负面影

响。且在收集两种金小蜂毒液时,有必要在提取液中加入蛋白酶抑制剂,以保证其生理活性。盐浓度对两种金小蜂毒液生理活性均无影响,故在对毒液中活性组分进行分离纯化过程中,以高浓度 NaCl 洗脱时不会影响毒液组分的生理活性。菜粉蝶 4 龄幼虫的中肠液和口腔分泌物均可使两种金小蜂毒液生理活性丧失,可能与其中多种蛋白酶的存在有关。

蛇、蜘蛛、蝎子及社会性膜翅目昆虫如蜜蜂、胡蜂、黄蜂和蚂蚁毒液中均含多种酶类,而寄生蜂毒液中有关酶类的研究较少(Doury *et al.*, 1997; Nakamatsu & Tanaka, 2004)。通过酶化学方法测定结果表明,两种金小蜂毒液中有碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、磷酸二酯酶和磷脂酶,酶活性随着毒腺器官的发育变化均呈下降趋势。丽蝇蛹集金小蜂毒液中还有广谱蛋白酶,而蝶蛹金小蜂毒液中则乏之。两种金小蜂毒液中酶种类的区别与其寄生类型有关,丽蝇蛹集金小蜂为外寄生蜂,幼虫在寄主蝇类围蛹内表皮上生存,通过口器刺破寄主表皮吸取寄主血淋巴获取生长发育所需营养,故丽蝇蛹集金小蜂毒液中的蛋白酶可能会促进寄主体内的蛋白其它水解途径或直接水解蛋白,供寄生蜂初孵幼虫发育利用。而蝶蛹金小蜂是一种内寄生蜂,幼蜂生活于寄主血腔内,可直接取食寄主体内的器官组织,利用其蛋白生长发育,故毒液中不需要蛋白酶的存在。丽蝇蛹集金小蜂毒液中的广谱蛋白酶活性于羽化后 2 d 内增长较快,而后稳定于某一水平,直至死亡,这与其寄生特性有一定的相关性,因丽蝇蛹集金小蜂羽化后即可产卵,而其寄生能力于羽化后 2~7 d 最强,故此时毒囊中毒液蛋白含量及毒液中广谱蛋白酶活性均维持在较高水平。毒液中各种酶在毒液中的功能尚需进一步研究。

4 对寄主发育及营养的调控作用

寄生蜂突破寄主的免疫系统作用后,通过各种方式调控寄主体内的营养状况,而这种调控作用可能内外兼有,从寄主的表皮到寄主体内的各种组织。表皮碳氢化合物有特征,故多用于昆虫分类的研究,用于区分近缘种或生物型(Lockey, 1976; Haverty & Nelsson, 1997; Carlson *et al.*, 1999; Cuvillier-Hot *et al.*, 2001),且在昆虫发育过程中,也有显著的时间特征,也可用于昆虫年龄的推测,对于表皮碳氢化合物作为被寄生虫感染后组成的变化仅 Trabalon 等(2000)做过研究,而对寄主被寄生蜂寄生后表皮碳氢化合物组成的变化尚未有过尝试,我们的研究表明,蝶蛹金小蜂的寄生对菜粉蝶蛹表皮碳氢化合物的组成无显著影响,而对柑桔凤蝶蛹表皮气相色谱图中 Bis(2-ethylhexyl)phthalate、Hexacosane、Heptacosane 和 Oxirane, heptadecyl-的相对含量有显著影响,就物质种类而言,杂环类化合物(17 烷基环氧乙烷)的含量于寄生后显著降低,表皮碳氢化合物一般无生理功能,而我们做了将其作为寄生标志物的尝试,两种寄主被同一寄生蜂寄生后,产生不同的结果,一方面说明任何一个寄生蜂-寄主系统均有其特殊性,另方面也说明,将其作为寄生标志物的难度之大。蝶蛹金小蜂的寄生可抑制菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹的羽化,说明蛹的发育已经受到抑制,故其体内激素特别是蜕皮激素的分泌可能受到抑制,在对蝶蛹金小蜂毒液中蛋白进行质谱分析时,也发现了点 1 和 2 与 20 羟蜕皮酮羟化酶相似,可能此蛋白与寄主蛹发育受抑制相关。Y 型管实验表明,蝶蛹

金小蜂更易对未寄生菜粉蝶蛹产生行为反应,说明雌蜂在产卵过程中,可能也对寄生蛹进行了标记,而寄生前后菜粉蝶蛹表皮正己烷提取物含量并未有显著变化,说明此标记物质可能为极性物质,可通过极性溶剂进行提取再做 GC-MS 分析,鉴定其中的产卵标记物的种类,并对其来源做深入分析和研究。

菜粉蝶和柑桔凤蝶被寄生或注射蝶蛹金小蜂毒液后,表皮中表皮蛋白含量无显著变化,但可引起菜粉蝶蛹表皮中可溶蛋白显著下降和柑桔凤蝶蛹表皮中可溶性蛋白的显著升高,说明寄主表皮中的表皮蛋白对寄生蜂幼虫来说可能是难以利用的,而表皮中的可溶性蛋白则是可以利用的资源。蝶蛹金小蜂寄生可引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹表皮脂类含量显著降低,注射毒液对表皮脂类含量无显著影响,说明寄主昆虫表皮中脂类对寄生蜂幼虫来说也是可以利用之资源,且蝶蛹金小蜂幼虫对柑桔凤蝶表皮脂类的利用要早于表皮中可溶性蛋白。

寄生蜂寄生或毒液还可调控寄主体内营养物质的变化,由于蝶蛹金小蜂幼虫生活于寄主的血腔内,血淋巴是供其发育的第一营养物质,因脂肪体是昆虫营养物质的主要合成器官,故脂肪体也是寄生蜂对寄主进行营养调控的主要靶标。蝶蛹金小蜂的寄生对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中蛋白含量均无显著影响,注射毒液则可引起二者血淋巴蛋白含量的显著升高,寄生或注射毒液均可引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹脂肪体蛋白含量的显著下降,说明蝶蛹金小蜂毒液有调控寄主体内脂肪体蛋白水解并释放至血淋巴的功能,这种调控肯定不是毒液的直接作用(因蝶蛹金小蜂毒液中不含蛋白酶),可能是毒液通过激活或促进脂肪体蛋白的水解途径来调控寄主脂肪体中蛋白水解至血淋巴中供幼虫发育利用。寄生或注射毒液均可引起菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血淋巴中脂类含量的显著下降,而对二者脂肪体中脂类含量均无显著影响,说明毒液可能“阻塞”寄主体内脂肪体脂类向血淋巴释放的路径。这与 *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 对寄主的调控作用又有相似之处, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* 寄生或注射毒液可引起寄主体内血淋巴蛋白和脂类含量的升高,而对脂肪体内两种物质含量无显著影响(Nakamatsu & Tanaka, 2003 a)。这可能与此蜂为外寄生蜂有关,因其幼蜂在寄主体表生活,通过吸取寄主体内血淋巴物质生长发育,而通过毒液的调控作用使脂肪体内营养物质向血淋巴中转运有利于幼虫更容易地获取营养,并完成生长发育。由此可推测,菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹脂肪体内蛋白质比脂类对蝶蛹金小蜂的发育更重要。

蝶蛹金小蜂寄生或注射毒液还可影响菜粉蝶血淋巴中游离氨基酸含量,寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸含量均无显著影响,但可引起总氨基酸含量的显著下降。注射毒液对菜粉蝶蛹血淋巴中各种氨基酸和总氨基酸含量均无显著影响。就氨基酸类别来说,蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸和杂环族氨基酸含量均无显著影响,但可引起脂肪族氨基酸含量的显著下降,说明蝶蛹金小蜂幼虫可直接利用菜粉蝶蛹血淋巴中的游离氨基酸,且对脂肪族氨基酸的利用有一定的偏好性,故在对此寄生蜂进行离体大规模培养时,人工饲料中可适当增加脂肪族氨基酸含量,以满足其发育的需要。菜粉蝶蛹日龄对未寄生、注射毒液和注射 TBS 的菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸、杂环族氨基酸及总氨基

酸含量均有显著影响,对寄生蛹血淋巴中芳香族和脂肪族氨基酸含量也有显著影响,而对寄生蛹血淋巴中杂环族氨基酸含量无显著影响,说明各种处理的菜粉蝶蛹血淋巴中芳香族和脂肪族氨基酸的合成及代谢均有其时间特征,蝶蛹金小蜂的寄生可抑制这种菜粉蝶蛹血淋巴中杂环族氨基酸的合成及水解,使之维持于某一水平。

5 寄生蜂毒液作用的靶标器官

寄生蜂毒液单独或与其它因子协同可作用于寄主的免疫系统 (Asgari *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2004; Parkinson *et al.*, 2002; Richards & Edwards, 2000a, b; Richards & Edwards, 1999 b; Richards & Parkinson, 2000 a; Richards & Edward, 2000 a; b; Rivers *et al.*, 2002; Shelby *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004a)、神经系统 (Bocchino & Sullivan, 1981; Klein & Becakge, 1990; Libesert, 2003; Parkinson & Weaver, 1999; Visser *et al.*, 1983)、生殖系统 (Digilio *et al.*, 2000; Jones, 1996; Reed & Beckage, 1997; Tagashira & Tanaka, 1998; Tanaka, *et al.*, 1994)、内分泌系统 (Beckage, 1985; Kelly *et al.*, 1998; Pennacchio *et al.*, 1997, 1998; Tanaka *et al.*, 1987; Tanaka & Vinson, 1991)、肌肉系统 (Beard, 1952) 和脂肪体 (Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; 2004) 等组织器官。而蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹神经系统的脑、咽下神经节,生殖系统的睾丸、成虫卵巢、消化系统的中肠及脂肪体和幼虫丝腺细胞的存活均无任何影响,反映在组织水平上则是毒液对菜粉蝶蛹的神经系统、消化系统、生殖系统及脂肪体功能无直接影响。丽蝇蛹集金小蜂毒液对菜粉蝶蛹的脑、咽下神经节、睾丸、成虫卵巢,中肠、脂肪体和幼虫丝腺细胞的贴壁存活均无任何影响,说明以上组织均非丽蝇蛹集金小蜂的作用靶标。

蝶蛹金小蜂毒液对非寄主昆虫非免疫系统来源的 Tn 细胞系和 Ha 细胞系的存活均有显著影响、丽蝇蛹集金小蜂毒液对 Ha 细胞系的存活也有显著影响,而对菜粉蝶的非免疫组织细胞的存活均显著影响,其原因尚待进一步研究。已有研究表明,丽蝇蛹集金小蜂毒液对双翅目昆虫胚胎来源的 NIH-SaPe4 和 CRL-1963 细胞系、鳞翅目昆虫卵巢来源的 TN-368 和 sf21、胚胎来源的 BT1-TN5B1-4 和脂肪体来源的 IPL-Ldfbel 及来源于脊椎动物的 ICR-2A 细胞系的存活均有显著影响 (Rivers *et al.*, 1999)。Parkinson & Weaver (1999) 也在瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 毒液中已经分离到对 sf 21 细胞系有毒性的小于 13 kDa 的蛋白。以上细胞系均是来源于昆虫的非免疫系统,甚至来源于更高等动物,寄生蜂毒液对存活有显著影响,能否说明以上细胞系来源的组织可能是某种寄生蜂毒液的潜在靶标器官?寄生蜂毒液对昆虫细胞系及其来源的组织器官的作用究竟有何不同?寄生蜂毒液诱导细胞系死亡的机理何在?都是值得深入探讨的问题。

6 寄生蜂毒液的作用范围

寄生蜂有其特定的寄主范围,而寄生蜂毒液的作用范围一般大于其寄主范围 (Jones & Coudron, 1993)。本论文的研究结果表明,蝶蛹金小蜂毒液可显著影响非寄主昆虫斜纹夜蛾

幼虫、家蝇和棕尾别麻蝇幼虫血细胞的延展和存活,而对其它昆虫如中华稻蝗成虫、美洲大蠊成虫、瘤缘蝽若虫、假眼小绿叶蝉若虫、小菜蛾幼虫、大蜡螟幼虫、大螟幼虫、棉铃虫幼虫、家蚕幼虫、直纹稻苞虫幼虫、大猿叶虫幼虫、中华蜜蜂幼虫、黑翅土白蚁成虫、茶尺蠖幼虫血细胞的延展和存活均无显著影响,也是在一定程度上证明了 Jones & Coudron (1993) 观点。蝶蛹金小蜂毒液对丽蝇蛹集金小蜂寄主血细胞的延展和存活有较强的抑制作用,而丽蝇蛹集金小蜂毒液仅对蝶蛹金小蜂寄主血细胞的延展有部分影响,说明两种毒液的作用范围有一定的交叉,毒液的功能有一定的相似性,可能与两种金小蜂存在近缘关系有关。由本论文研究结果看来,内寄生蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围似更宽,这可能也与内寄生蜂和外寄生蜂的习性有关,内寄生蜂卵和幼蜂生活于寄主血淋巴中,直接面对寄主血细胞的作用,因而在未有其它主动抑制因子(如 PDV 等)的情况下,毒液须抑制寄主血细胞的免疫反应或通过免疫逃避,才能保证蜂卵的孵化及幼蜂的正常发育。而外寄生蜂的卵和幼蜂生活于寄主体表,寄主血细胞不直接作用于其上,故在长期进化过程中,毒液主要功能转化为麻痹作用、调节寄主生长发育及其体内营养状况,为寄生蜂幼蜂的发育提供合适的生理环境(Rivers & Denlinger, 1994; 1995 a; Doury *et al.*, 1995; Coudron & Brandt, 1996; Marris *et al.*, 2000; Rinehart & Denlinger, 2002; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; b)。尽管外寄生蜂毒液还具有抑制寄主血细胞免疫和体液免疫的功能(Richards & Edward, 2000 a; Rivers *et al.*, 2002),并可诱导昆虫细胞系的死亡(Rivers *et al.*, 1993; 1999),但这可能是其毒液的次要功能。故内寄生性的蝶蛹金小蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围较外寄生性的丽蝇蛹集金小蜂宽的原因所在。

丽蝇蛹集金小蜂毒液对蜜蜂成虫也有很强的毒性(Rivers *et al.*, 1993),而我们研究表明,蜜蜂幼虫血细胞的延展和存活均无显著作用,可能蜜蜂血细胞不存在丽蝇蛹集金小蜂毒液的作用位点,蜜蜂幼虫血细胞的延展和存活均无显著作用,而注射毒液后的蜜蜂未表现有麻痹现象,说明丽蝇蛹集金小蜂毒液并非通过麻痹而使昆虫死亡。故我们认为外寄生蜂毒液主要对寄主昆虫进行发育和营养调控,而内寄生蜂则主要进行营养和免疫方面的调控。另外,蝶蛹金小蜂毒液 Tn 细胞系有很强的毒性,而丽蝇蛹集金小蜂毒液对 Tn 细胞系的延展和存活均无显著影响,与 Rivers 等(1993)的研究相反,可能与两种细胞系来源于同一昆虫的不同组织有关。两种金小蜂毒液对 Ha 细胞均有较强毒性,且蝶蛹金小蜂毒液毒性更强一些,但两种毒液对棉铃虫血细胞的延展及存活均无显著影响,可能棉铃虫血细胞不存在两种毒液的作用位点,而卵巢来源的 Ha 细胞系则可能存在其作用位点。

内寄生蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围似更宽,这可能也与内寄生蜂和外寄生蜂的习性有关,内寄生蜂卵和幼蜂生活于寄主血淋巴中,直接面对寄主血细胞的作用,因而在未有其它主动抑制因子(如 PDV 等)的情况下,毒液须抑制寄主血细胞的免疫反应或通过免疫逃避,才能保证蜂卵和孵化及幼蜂的正常发育。而外寄生蜂的卵和幼蜂生活于寄主体表,寄主血细胞不直接作用于其上,故在长期进化过程中,毒液主要功能转化为麻痹作用、调节寄主生长发育及其体内营养状况,为寄生蜂幼蜂的发育提供合适的生理环境(Coudron & Brandt,

1996; Doury *et al.*, 1995; Marris *et al.*, 2000; Nakamatsu & Tanaka, 2003 a; b; Rinehart & Denlinger, 2002; Rivers & Denlinger, 1994; 1995 a)。而尽管外寄生蜂毒液还具有抑制寄主血细胞免疫和体液免疫的功能 (Richards & Edward, 2000 a; Rivers *et al.*, 2002), 并能诱导昆虫细胞系的死亡 (Rivers *et al.*, 1993; 1999), 但这可能是其毒液的次要功能。这也可能是蝶蛹金小蜂毒液对昆虫血细胞的作用范围较丽蝇蛹集金小蜂宽的原因所在。蝶蛹金小蜂毒液可抑制斜纹夜蛾幼虫血细胞的延展, 可能与斜纹夜蛾与菜粉蝶和柑桔凤蝶血细胞有相似的结构有关。蝶蛹金小蜂毒液可抑制丽蝇蛹集金小蜂寄主——家蝇和棕尾别麻蝇血细胞的延展, 而高剂量的丽蝇蛹集金小蜂毒液也可抑制蝶蛹金小蜂寄主血细胞的延展 (第八章), 说明两种毒液中可能有相同的活性组分。以上推断均需做进一步研究才能证实。

两种金小蜂毒液对均可诱导 Ha 细胞的死亡, 故此两种毒液中均存在细胞毒性因子, 而此两种毒液中的细胞毒性因子是否相同? 二者诱导细胞死亡的机理是否相同? 此细胞因子与 Rivers 等 (1993 和 1999) 和 Parkinson 和 Weaver (1999) 所报道的毒液中的细胞毒性因子有何关系? 都值得做进一步研究。

本论文创新之处:

1. 研究蝶蛹金小蜂生殖系统对菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞延展、存活及包裹作用的影响, 明确毒液是抑制寄主细胞免疫的主要因子;
2. 对蝶蛹金小蜂毒液中部分蛋白进行质谱鉴定, 并明确这些蛋白可能为一些新的蛋白;
3. 研究两种金小蜂毒液对不同昆虫血细胞延展与存活的影响, 建立一种快速评价寄生蜂寄主范围的方法平台。

今后研究方向:

1. 研究蝶蛹金小蜂毒液抑制菜粉蝶和柑桔凤蝶蛹血细胞延展、存活和包裹作用的机理;
2. 明确蝶蛹金小蜂毒液抑制寄主血细胞免疫反应的活性组分及诱导两种昆虫细胞系死亡的活性因子, 并做后续研究;
3. 通过 RACE 或构建 cDNA 文库的方法, 克隆菜粉蝶、丽蝇蛹集金小蜂和蝶蛹金小蜂酚氧化酶基因全长, 并做后续研究。

参考文献

- 白素芬, 陈学新, 程家安, 符文俊, 何俊华, 2003. 菜蛾盘绒茧蜂多分 DNA 病毒的特性及其对小菜蛾幼虫的生理效应. 昆虫学报 46, 401 - 408.
- 蔡峻, 吕慧平, 叶恭银, 胡萃, 2001. 假寄生对菜粉蝶血细胞总数和包囊能力的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版) 27, 15 - 18.
- 蔡峻, 吕慧平, 叶恭银, 胡萃, 2002. 快速评价内寄生蜂雌蜂携带因子生理活性的简易方法. 植物保护学报 29, 25 - 30.
- 蔡峻, 叶恭银, 胡萃, 2000. 寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中血细胞和可溶性蛋白组份的影响. 植物保护学报 17, 151 - 156.
- 杭三保, 陆自强, 1991. 二化螟幼虫被二化螟绒茧蜂寄生后血淋巴的生理生化变化. 昆虫学报 34, 427 - 432.
- 胡萃, 1986. 蝶蛹金小蜂发育速率与温度的关系. 昆虫学报 9, 101 - 103.
- 胡萃, 万兴生, 1988. 蝶蛹金小蜂性比的研究. 昆虫学报 31, 332 - 335.
- 胡萃, 俞伯良, 1987. 蝶蛹金小蜂散放试验. 昆虫天敌 9, 199 - 202.
- 李影林主编. 临床医学检验手册. 吉林: 吉林科学技术出版社 1987, 363 - 373.
- 吕慧平, 蔡峻, 叶恭银, 徐红星, 胡萃, 2000. 寄生对越冬代菜粉蝶蛹血淋巴中蛋白质和糖类代谢的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版) 26, 611 - 615.
- 秦启联, 龚和, 丁翠, 王方海, 2000. 中红侧沟茧蜂在粘虫体内的发育及畸形细胞发生. 昆虫学报 43, 280 - 284.
- 沈立荣, 2002. 中蜂、意蜂蜂毒磷脂酶A₂和透明质酸酶基因的克隆与表达. 浙江大学博士学位论文.
- 唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据统计分析系统. 北京: 科学出版社.
- 王琛柱, 钦俊德, 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报 39, 7 - 14.
- 叶恭银, 胡萃, 1998. 寄生蜂防御寄主免疫系统的策略及其在害虫防治中的应用前景. 见: 俞晓平 主编. 中国无公害农业的发展策略和途径. 北京: 中国农业出版社. 134 - 146.
- 尹丽红, 王琛柱, 钦俊德, 2001. 多分DNA病毒及其在寄生蜂与寄主关系中的作用. 昆虫学报 44, 109 - 118.
- 朱光辉, 2003. 尸食性蝇类的生物化学特征用于死后间隔时间推断的基础研究. 浙江大学博士学位论文.
- Aizawa T, Fujitani N, Hayakawa Y, Ohnishi A, Ohkubo T, Kumaki Y, Kawano K, Hikichi K, and Nitta K, 1999. Solution structure of an insect growth factor, growth-blocking peptide. J. Biol. Chem. 274, 1887 - 1890.
- Alleyne M, Beckage N E, 1997. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. J. Insect Physiol. 43, 407 - 424.
- Alleyne M, Chappell M A, Gelman D B, Beckage N E, 1997. Effects of parasitism by the Braconid wasp *Cotesia congregata* on metabolic rate in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J Insect Physiol. 43, 143 - 154.
- Arthur A P and Ewen A B, 1975. Cuticular encystment: a unique and effective defense reaction by cabbage looper larvae against parasitism by *Banchus flavescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 68, 1091 - 1094.
- Asgari S, Schmidt O, 1994. Passive protein of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula* in the host, *Pieris rapae*. J. Insect Physiol. 40, 789 - 795.
- Asgari S, Theopold U, Wellby C, and Schmidt O, 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3690 - 3695.
- Asgari S, Zhang G, Zareie R, Schmidt O, 2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. Insect Biochem. Molec. Biol. 33, 1017 -

- 1024.
- Ashida M, Brey P T, 1998. Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P T, Hultmark, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman and Hall, London, pp. 135 - 172.
- Assi A A, Nasser H, 1999. An *in vitro* and *in vivo* study of some biological and biochemical effects of *Sistrurus Malarius Barbouri* venom. *Toxicol.* 137, 81 - 94.
- Banks B E C and Shipolini R, 1986. Chemistry and pharmacology of honeybee venom. In: *Venoms of the Hymenoptera*. P. 329 (Piek T, Ed.). London: Academic Press.
- Barras D J, Wiygul G, Vinson S B, 1969. Amino acids in the hemolymph of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* Fab., as affected by its habitual parasite, *Cardiochiles nigriceps* Viereck. *Com. Biochem. Physiol.* 31, 707 - 714.
- Beard R L, 1952. The toxicity of *Habrobracon* venom: A study of a natural insecticide. *Connecticut Exp. St. Bull.* 562, 3 - 27.
- Beckage N E & Gelman D B, 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Ann. Rev. Entomol.* 49, 299 - 330.
- Beckage N E, 1985. *Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts*. *Ann. Rev. Entomol.* 30, 371 - 413.
- Beckage N E, 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses. *Parasitology* 116 (S), 57 - 64.
- Beckage N E, Kanost M R, 1993. Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnvirus. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23, 643 - 653.
- Beckage N E, Metcalf J S, Nesbit D J, Schleifer K W, Zetlan S R, De Buron I, 1990. Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnvirus. *Insect Biochem.* 20, 285 - 294.
- Bender, J G, 1943. Anatomy and histology of the female reproductive organs of *Habrobracon juglandis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 36, 537 - 545.
- Benton A W, 1967. Esterases and phosphatases of honeybee venom. *J. Apicult. Res.* 6, 91.
- Bettini S (Ed.), 1978. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 48, Berlin: Springer-Verlag.
- Blum M S and Hermann H R, 1978. Venoms and venom apparatuses of the Formicidae: Myrmecinae, *Pharmacology*, Vol. 48, p. 801 (Bettini S, Ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Bocchino F J and Sullivan D J, 1981. Effects of venoms from two aphid hyper-parasitoids, *Asaphes lucens* and *Dendrocerus carpenteri* (Hymenoptera: Pteromalidae and Megaspilidae), on larvae of *Aphidius smithii* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Can. Entomol.* 113, 887 - 889.
- Bordenstein S R, Drapeau M D, Werren J H, 2000. Intraspecific variation in sexual isolation in the jewel wasp *nasonia*. *Evolution* 54, 567.
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 - 254.
- Brandt S L, Coudron, T A, Jones D, Racquib A, 1996. Regulation of storage protein production in envenomated host larvae parasitized by *Euplectrus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae). *Toxicon* 34, 328 - 329.
- Brehelin M, Ochiai M Niki T, 1989. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19, 301 - 307.
- Brown J J, Friedländer M, 1995. Influence of parasitism on spermatogenesis in the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Insect Physiol.* 11, 957 - 963.
- Cai J, Ye G Y, Hu C, 2001. Effect of parasitization by the pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum*

- (Hymenoptera: Pteromalidae) on humoral immune reactions of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Entomological Sinica*, 8, 335 - 342.
- Cai J, Ye G Y, Hu C, 2004. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. *J. Insect Physiol.* 50, 315-322.
- Carlson D A, Geden C J, Bernier U R, 1999. Identification of pupal exuviae of *Nasonia vitripennis* and *Muscidifurax raptorellus* parasitoids using cuticular hydrocarbons. *Biol. Control* 15, 97- 106.
- Chen C S, Mulla M S, March R B, et al, 1990. Cuticular hydrocarbon patterns in *Culex quinquefasciatus* as influenced by age, sex and geography. *Bull. Soc. Vect. Ecol.* 15, 129-139.
- Clark K D, Garczynski S F, Arora A, Crim J W, and Strand M R, 2004. Specific residues in plasmatocyte-spreading peptide are required for receptor binding and functional antagonism of insect immune Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 33246 - 33252.
- Clark K D, Pech L L, and Strand M R, 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J. Biol. Chem.* 272, 22440 - 23447.
- Clark K D, Volkman B F, Thoetkiattikul H, King D, Hayakawa Y, and Strand M R, 2001. Alanine-scanning mutagenesis of plasmatocyte spreading peptide identifies critical residues for biological activity. *J. Biol. Chem.* 276, 18491 - 18496.
- Cohen J E, Jonsson T, Müller C B, Godfray H C J, and VanSavage M, 2005. Body sizes of hosts and parasitoids in individual feeding relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 684 - 689.
- Consoli F L, Vinson S B, 2004. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 137 B, 463 - 473.
- Coudron T A and Brandt S L, 1996. Characteristic of developmental arrestant in the venom of the ectoparasitoid wasp *Euplectrus comstockii*. *Toxicon* 34, 1431 - 1441.
- Coudron T A, Brandt S L, Raqib A, 1997. Comparison of the response of *Heliothis virescens* to parasitism by *Euplectrus comstockii* and *Euplectrus plathypenae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 116, 197 - 202.
- Coudron T A, Iqbal M, Rice W C, Ellersieck M R, Pinnell R E, 1999. Mediated pathogenicity of the baculovirus AcMNPV by the venom from *Euplectrus comstockii* Howard (Hymenoptera: Eulophidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 124 B, 231 - 240.
- Coudron T A, Jones D, 1994. Premature production of late larval storage proteins in larvae of *Trichoplusia ni* parasitized by *Euplectrus comstockii*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 97 - 109.
- Coudron T A, Kelly T J, Puttler B, 1990. Developmental responses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to parasitism by the ectoparasite *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 13, 83 - 94.
- Coudron T A, Puttler B, 1988. Response of natural and factitious hosts to the ectoparasite *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81, 931 - 937.
- Coudron T A, Raqib A, Brandt S L, Wright M K, 1998. Comparison of the hemolymph proteins in permissive and non-permissive of *Euplectrus comstockii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 B, 349 - 357.
- Coudron T A, Wright M K, Brandt S L, 2000. Tissue, molting, and hormone titer response in permissive hosts to the venom from the ectoparasite, *Euplectrus comstockii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126, S27.
- Coudron T A, Wright M M K, Puttler B, Brandt S L, Rice W C, 1993. Effect of ectoparasite *Necremnus breviramulus* (Hymenoptera: Eulophidae) and its venom on natural and factitious hosts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93, 890 - 897.
- Coudron T A, Wright M M K, Puttler B, Brandt S L, Rice W C, 2000. Effect of ectoparasite *Necremnus breviramulus* (Hymenoptera: Eulophidae) and its venom on natural and factitious hosts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93, 890 - 897.

- Coundron T A, Iqbal M, Rice W C, Ellersieck M R, Pinnell R E, 1999. Mediated pathogenicity of the baculovirus AcMNPV by the venom from *Euplectrus comstocki* Howard (Hymenoptera: Eulophidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 124 B, 231 - 240.
- Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C, 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Insect Physiol.* 47, 485-493.
- da Silvera R B, Filho J F S, Mangili O C, Vgiga S S, Gremski W, Nader H B, von Dietrich C P, 2002. Identification of protease in the extract from brown spiders. *Toxicon* 40, 815 - 822.
- Dahlman D L, Vinson S B, 1976. Trehalose level in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Campoletis sonorensis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 523 - 524.
- Dahlman D L, 1970. Trehalose levels in parasitized and no parasitized tobacco hornworm *Manduca sexta* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63, 615 - 617.
- Dahlman D L, 1975. Trehalose and glucose levels in hemolymph of diet reared to tobacco leaf-reared and parasitized tobacco hornworm larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A, 165 - 167.
- Dahlman D L, Coar D L, Koller C N, Neary T J, 1990. Contributing factors to reduced ecdysteroid titers in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 13, 29 - 39.
- Dahlman D L, Vinson S B, 1976. Trehalose and glucose levels in the hemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes* or *Cardiochiles nigriceps*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B, 465 - 468.
- Dani M P, Richards E H, Edwards J P, 2004. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 86, 19 - 25.
- Dani M P, Richards E H, Isaac R E, Edwards J P, 2003. Antibacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Insect Physiol.* 49, 945 - 954.
- Davies D H, Strand M R, Vinson S B, 1987. Changes in differential hemocyte count and *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus. *J. Insect Physiol.* 33, 143 - 153.
- Davies D H, Strand M R, Vinson S B, 1987. Changes in differential hemocyte count and *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *J. Insect Physiol.* 33, 143 - 153.
- Davies D, Vinson S B, 1986. Passive evasion by eggs of the braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* from encapsulation *in vitro* by hemocytes of host *Heliothis virescens*. *J. Insect Physiol.* 32, 1003 - 1010.
- Dejong M C J M and Bleumink E, 1977. Investigative studies of the dermatitis caused by the larva of the brow-tailed moth, *Euproctis chrysorrhoea* L. (Lepidoptera, Lymantriidae). *Arch. Derm. Res.* 259, 263.
- Dejong M C J M, Bleumink E and Nater J P, 1975. Investigative studies of the dermatitis caused by the larva of the brow-tailed moth (*Euproctis chrysorrhoea* Linn) I. Clinical and experimental findings. *Arch. Derm. Res.* 253, 287.
- Dejong M C J M, Kawamoto F, Bleumink E, Kloosterhuis A J and Meijer G T, 1982. A comparative study of the spicule venom of *Euproctis* caterpillars. *Toxicon* 20, 477.
- Desena M L, Clark J M, Edman J D, 1999. Potential for aging female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by gas chromatographic analysis of cuticular hydrocarbons, including a field evaluation. *J. Med. Entomol.* 36, 811-823.
- Deshimaru M, Ogawa T, Nakashima K, Nobuhisa I, Chijiwa T, Shimohigashi Y, Fumumaki Y, Niwa M, Yamashina I, Hattori S, Ohno M, 1996. Accelerated evolution of crotalinae snake gland serine proteases. *FEBS Lett.* 397, 83 - 88.
- Digilio M C, Isidoro N, Tremblay E, Pennacchio F, 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J. Insect Physiol.* 46, 1041 - 1050.

- Digilio M C, Pennacchio F, Tremblay E, 1998. Host regulation effects of ovary fluid and venom by *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Insect Physiol.* 44, 779 - 784.
- Dong K, Zhang D, Dahlman D L, 1996. Down-regulation effects of juvenile hormone esterase and arylphorin production in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*. *Arch. Insect Biochem, Physiol.* 32, 237 - 248.
- Doucet D, Cusson M, 1996. Role of calyx fluid in alteration of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114, 311 - 317.
- Doury G Rojas-Rousse D, Periquet G, 1995. Ability of *Eupelmus orientalis* ectoparasitoid larvae to develop on an unparasitised host in the absence of female stinging behaviour. *J. Insect Physiol.* 41, 287 - 296.
- Doury G, Bigot Y, Periquet G, 1997. Physiological and biochemical analysis of factors in the female venom gland and larval salivary secretions of the ectoparasitoid wasp *Eupelmus orientalis*. *J. Insect Physiol.* 43, 69 - 81.
- Dudler T, Chen W Q, Wang S S, Schneider T, *et al*, 1992. High-level expression in *Escheichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A₂. *Biochem. Biophys Acta.* 1165, 201 - 210.
- Ederly H, Ishay J, Gitter S and Joshua H, 1978. Venoms of Vespidae. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 48, p., 691, (Bettini S, Ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Ederly H, Ishay J, Lass I and Gitter S, 1972. Pharmacological activity of oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. *Toxicon* 10, 13.
- Edson K M & Vinson S B, 1979. A comparative morphology of the venom apparatus of female braconids (Hymenoptera: Braconidae). *Can. Entomol.* 111, 1013 - 1024.
- Edson K M, Barlin M R and Vinson S B, 1982. Venom apparatus of braconid wasps: Comparative ultrastructure of reservoirs and gland filaments. *Toxicon* 20, 553 - 562.
- El-Sawaf B M and Zohdy N Z M, 1976. Host- parasite relationship. 2-Cholinesterase activity of the larvae of the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lep: Pyralidae) parasitized by *Bracon hebetor* (Hym.: Braconidae). *Entomophaga* 21, 99 - 101.
- Eslin P, Prévost G, 2000. Racing against host's immunity defenses: a likely strategy from passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. *J. Insect Physiol.* 46, 1161 - 1167.
- Fleming J G W, 1992. Polydnviruses: mutualism and pathogens. *Ann. Rev. Entomol.* 37, 401 - 451
- Franchini A, Miyan J A, Ottaviani E, 1996. Induction of ACTH and TNF-alpha-like molecules in the hemocytes of *Calliphora vomitoria* (Insecta, Diptera). *Tissue and Cell* 28, 587 - 592.
- Fukushima J I, Kuwahara Y, Yamada A and Suzuki T, 1990. New non-cyclic hono-diterpene from the sting glands of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). *Agric. Biol. Chem.* 54, 809 - 810.
- Gelman D B, Khalidi A A, Loeb M J, 1997. Improved techniques for the rapid radioimmunoassay of ecdysteroids and other metabolites. *Invertebr. Rep. Dev.* 32, 127 - 129.
- Genedani S, Bernardi M, Ottaviani E, Franceschi C, Leung M K, Stefano G B, 1994. Differential modulation of invertebrate immunity by CRF, ACTH, and its fragments. *Peptides* 15, 203 - 206.
- Geren C Rand Odell G V, 1984. The biochemistry of spider venoms. In: *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 2, p 441 (Tu A T, Ed.). New York: Marcel Dekker.
- Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42, 611 - 643.
- Glatz R, Schmidt O, and Asgari S, 2003. Characterization of a novel protein with homology to C-type lectins expressed by the *Cotesia rubecula* bracovirus in larvae of the lepidopteran host, *Pieris rapae*. *J. Biol. Chem.* 278, 19743 - 19750.
- Grossniklaus-Bürgin C, Pfister-Wilhelm R, Meyer V, Treiblmayr K, Lanzrein B, 1998. Physiological and endocrine changes associated with polydnvirus/venom in parasitoid-host system, *Chelonus inanitus* -

- Spodoptera littoralis*. J. Insect Physiol. 44, 305 - 321.
- Guerra A A, Robacker K M and Martinez S, 1993. Free amino acid and protein titers in *Anthonomus grandis* larvae venomized by *Bracon mellitor*. Entomophaga 34, 519 - 525.
- Gupta P, Ferkovich S M, 1998. Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Heliothis virescens* and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 44, 713 - 719.
- Guzo D, Stoltz D B, 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. J. Insect Physiol. 33, 19 - 31.
- Habermann E, 1971. Chemistry, pharmacology and toxicology of bee, wasp and hornet venoms. In: *Venomous animals and their venoms*, Vol. 3, p. 61, (Buckner, W and Buckley E E, Eds). New York: Academic Press.
- Haverty M J, Nelson L J, 1997. Cuticular hydrocarbons of reticulitermes (Isoptera: Rhinotermitidae) from northern California indicate undescribed species. Comp. Biochem. Physiol. 118 B, 869-880.
- Hayakawa Y, 1990. Juvenile hormone esterase activity repressive factor in the plasma of parasitized insect larvae. J. Biol. Chem. 265, 10813 - 10816.
- Hayakawa Y, 1991. Structure of a growth-blocking peptide present in parasitized insect hemolymph. J. Biol. Chem. 266, 7982 - 7984.
- Hayakawa Y, 1994. Cellular immunosuppressive protein in the plasma of parasitized insect larvae. J. Biol. Chem. 269, 14536 - 14540.
- Hayakawa Y, Yazaki K, 1997. Envelope protein of wasp PDV protects wasp eggs from cellular immune reactions of host. Eur. J. Biochem. 246, 820 - 826.
- Hill R E, Mackessy S P, 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. Toxicon 38, 1663 - 1687.
- Hoch G, Schopf A, 2001. Effects of *Glyptapanteles liparidis* (Hym.: Braconidae) parasitism, polydnavirus, and venom on development of microsporidia-infected and uninfected *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae) larvae. J. Invertebr. Pathol. 77, 37 - 43.
- Hochuli A, Pfister-Wilhelm R, Lanzrein B, 1999. Analysis of endoparasitoid-released proteins and their effects on host development in the system *Chelonus inanitus* (Braconidae)-*Spodoptera littoralis* (Noctuidae). J. Insect Physiol. 45, 823 - 833.
- Hoffman D R and Wood C L, 1984. Allergens in Hymenoptera venom XI. Isolation of protein allergens from *Vesputa maculifrons* (yellowjacket) venom. J. Allergy Clin. Immun. 74, 93.
- Hoffman D R, 1977 a. Allergens in bee venom III. Identification of allergen B of the bee venom as an acid phosphatase. J. Allergy Clin. Immun. 59, 364.
- Hoffman D R, 1977 b. Allergens in bee venom IV. Comparison of venom and venom sac extracts. J. Allergy Clin. Immun. 59, 367.
- Hoffman D R, 1978. Allergens in Hymenoptera venom. V. Identification of some of the enzymes and demonstration of multiple allergens in yellowjacket venom. Ann. Allergy 40, 171.
- Hopkins T L, Kramer K J, 1992. Insect cuticle sclerotization. Ann. Rev. Entomol. 32, 71 - 93.
- Hu J, Zhu X X, Fu W J, 2003. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). J. Insect Physiol. 49, 367 - 375.
- Hughes T K, Smith E M, Chin R, Cadet P, Sinisterra J, Leung M K, Shipp M A, Scharrer B, Stefano G B, 1990. Interactions of immunoreactive monokines (interleukine-1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4426 - 4429.
- Ishay J, Nadlek E Z and Gitter S, 1973. Pharmacological activity of *Paravespula germanica* wasp venom. Acta

- Pharmac. 33, 157.
- Iwanaga S and Suzuki T, 1979. Enzymes in snake venom. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol, 52, p 61 (Lee C, -Y, Ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Jones D and Coudron T A, 1993. Venoms of parasitic Hymenoptera as investigatory tools. In *Parasites and Pathogens of insects*, Vol. 1 (Eds Beckage N E, Thompson S N and Federici B A), pp. 227 - 244. Academic Press, New York.
- Jones D, 1996. Biochemical interaction between Chelonin wasps and their Lepidopteran hosts: After a decade of research – the parasite is in control. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 981 - 996.
- Jones D, Gelman D and Loeb M, 1992. Hemolymph concentrations of host ecdysteroids are strongly suppressed in precocious prepupae of *Trichoplusia ni* parasitized and pseudoparasitized by *Chelonus near curvimaculatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21, 155 - 165.
- Jones D, Karishnan A, Scrhari N, Wozniak M, 1994. Isomeric and quaternary properties of homogenous 33 kDa protein from the venom of *Chelonus near curvimaculatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 83 - 95.
- Jones D, Leluk J, 1990. Venom proteins of endoparasitic wasp *Chelonus near curvimaculatus*: characterization of the major components. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 13, 95 - 106.
- Jones D, Wache S, 1998. Preultimate 4th/5th instar *Trichoplusia ni* naturally – injected with venom/calyx fluid from *Chelonus curvimaculatus* precociously metamorphose, rather than obey the metamorphic size threshold that would normally complete molting to a 5th/6th instar. *J. Insect Physiol.* 44, 755 - 765.
- Kelly T J, Coudron T A, 1990. Total and specific ecdysteroids in the haemolymph of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasite, *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae). *J. Insect Physiol.* 36, 463 - 470.
- Kelly T J, Gelman D B, Darcy A, Beckage N E, 1998. Effects of parasitization by *Cotesia congregata* on the brain-prothoracic gland axis of its host, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 44, 323 - 332.
- King T P, Alagon A C, Kuan J, Sobotka A K and Lichtenstein L M, 1983. Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. *Molec. Immunol.* 20, 297.
- King T P, Kochoumian L and Joslyn A, 1984. Wasp venom proteins: phospholipase A₁ and B. *Arch Biochem. Biophys.* 230, 1.
- Kinuthia W, Li D M, Schmidt O, Theopold U, 1999. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *J. Insect Physiol.* 45, 501 - 506.
- Kitano H, 1982. Effect of venom of the gregarious parasitoid *Apanteles glomeratus* on its hemocytic encapsulation by the host, *Pieris*. *J. Invertebr. Pathol.* 40, 61 - 67.
- Kitano H, 1986. The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host *Pieris rapae crucivora*. *J. Insect Physiol.* 32, 369 - 375.
- Klein J A and Beckage N E, 1990. Comparative suitability of *Trogoderma variabile* and *T. glarum* (Coleoptera: Dermestidae) as hosts for the ectoparasite *Laelius peatus* (Hymenoptera: Bethyridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83, 809 - 816.
- Kraaijeveld A R, van Alpen J M, 1994. Geographical variation in resistance of the parasitoid *A. tabida* against encapsulation by *D. melanogaster* larvae: the mechanism explored. *Physiol. Entomol.* 19, 9 - 14.
- Krishnan A, Nair P N, Jone D, 1994. Isolation, cloning and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J. Biol. Chem.* 269, 20971 - 20976.
- Kuchler D, Gmechl M, Sippl M J, Dreil G, 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A₂ from honeybee venom glands: the deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184, 249 - 254.
- Kudo K, Tu A T, 2001. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 154 - 162.

- Kwon T H, Kim M S, Choi H W, Joo C H, Cho M Y, Lee B L, 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* 267, 6188 - 6196.
- Lanz H, Tsutsumi V, and Arechiga H, 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 389 - 397.
- Lavine M D, Beckage N E, 1995. Polydnviruses-potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitol. Tod.* 11, 368 - 378.
- Lavine M D, Beckage N E, 1996. Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *J. Insect Physiol.* 42, 41 - 51.
- Lawrence P O and Akin D, 1990. Virus-like particles from the poison glands of the parasitic wasp *Biosteres longicandatus* (Hymenoptera: Braconidae). *Can. Zool.* 68, 539 - 546.
- Lee K Y, Zhang R, Kim M S, Park J W, Kawabata S, Lee B L, 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur. J. Biochem.* 269, 4375 - 4383.
- Leluk J, Schmidt J and Jones, 1989. Comparative studies on the protein composition of Hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon* 27, 105.
- Libesert L, 2003. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J Comp Physiol A* 189, 497 - 508.
- Little S, Wypych J I, Noble R W, Abeyounis C J and Reisman R E, 1985. Allergenic components of bald-faced hornet (*V. Maculata*) venom. *Int. Arch. Aller. Appl. Immun.* 76, 1.
- Lockey K H, 1976. Cuticular hydrocarbons of *Locusta*, *Schistocera* and *Periplaneta* and their role in waterproofing. *Insect Biochem.* 6, 457 - 472.
- Luckhart S, Webb B A, 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnvirus in host immune suppression. *Dev. Com. Immunol.* 20, 1 - 21.
- Marris G C, Bell H A, Naylor J M, Edwards J P, 1999. The role of *Pimpla hypochondriaca* venom in the suppression of pupal Nocuid host immunity. *Entomol. Exp. Appl.* 93, 291 - 298.
- Marris G C, Weaver R J, Edwards J P, 2000. Endocrine interactions of ectoparasitoid wasps with their hosts - An overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 126 B, S64.
- Matsui T Fujimura Y, Titani K, 2000. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1477, 146 - 156.
- Missios S, Davidson H C, Linder D, Mortimer L, Okobi A O, Doctor J S, 2000. Characterization of cuticular proteins in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 47-56.
- Morale-Ramos J A, Rojas M G and King E G, 1995. Venom of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) and its role in parasitoid development and host regulation. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88, 800 - 808.
- Moreau S J M, Dingremont A, Doury G, Giordanengo P, 2002. Effects of parasitism by *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) on the development, survival and activity of *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.* 48, 337 - 347.
- Moreau S J M, Eslin P, Giordanengo P, Doury G, 2003. Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 273 - 282.
- Nakahara Y, Hiraoka T, Iwabuchi K, 1999. Effects of lipophorin and 20-hydroxyecdysone on in vitro development of the larval endoparasitoid, *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Insect Physiol.* 45, 453 - 460.
- Nakajima T, 1986. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: *Venoms of the Hymenoptera*. P. 309 (Pick T, Ed.). London: Academic Press.

- Nakamatsu Y, Fujii S, Tanaka T, 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. J. Insect Physiol. 48, 1041 - 1052.
- Nakamatsu Y, Gyotoku Y, Tanaka T, 2001. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. J. Insect Physiol. 47, 573 - 584.
- Nakamatsu Y, Tanaka T, 2003 a. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. J. Insect Physiol. 49, 149 - 159.
- Nakamatsu Y, Tanaka T, 2003 b. Development of a gregarious ectoparasitoid, *Euplectrus separatae* (Hymenoptera: Eulophidae), that parasitizes *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae). Arth. Stru. Dev. 32, 329 - 336.
- Nakamatsu Y, Tanaka T, 2004. Venom of *Euplectrus separatae* causes hyperlipidemia by lysis of host fat body cells. J. Insect Physiol. 50, 267 - 275.
- Nappi A J, Christensen B M, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. Insect Biochem. Molec. Biol. 35, 443 - 459.
- Nur U, Werren J H, Eickbush D G., Burke W D, Eickbush T H, 1988. A "Selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. Science. 240, 512-514.
- Oliver K M, Russell J A, Moran N A, and Hunter M S, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 1803-1807.
- Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S, Genedani S, 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. Biol. Cell 85, 87 - 91.
- Owen M D, Pfaff L A, Reisman R E, et al, 1990. Phospholipase A₂ in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. Toxicon 28, 813 - 820.
- Parkinson N M, Conyers C M, Keen J N, MacNicoll A D, Smith I, Weaver R J, 2003. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. Comp. Biochem. Physiol. 134 C, 513 - 520.
- Parkinson N M, Weaver R J, 1999. Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. J. Invertebr. Pathol. 73, 74 - 83.
- Parkinson N, Richards E H, Conyers C, Smith I, Edwards J P, 2002. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. Insect Biochem. Molec. Biol. 32, 729 - 735.
- Parkinson N, Smith I, Audsley, N Edwards J P, 2002. Purification of pimplin, a paralytic heterodimeric polypeptide from venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*, and cloning of the cDNA encoding one of the subunits. Insect Biochem. Molec. Biol. 32, 1769 - 1773.
- Parkinson N, Smith I, Weaver R, Edwards J P, 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. Insect Biochem. Molec. Biol. 31, 57 - 63.
- Pech L L, Strand M R, 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. J. Insect Physiol. 46, 1565 - 1573.
- Pennacchio F, Falabella P, Sordetti R, Varricchio P, Malva C, Vinson B, 1998. Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), J. Insect Physiol. 44, 845 - 857.
- Pennacchio F, Sordetti R, Falabella P, Vinson S B, 1997. Biochemical and ultrastructural alterations in prothoracic glands of the *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) last instar larvae parasitized by the *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), J. Insect Physiol. 27, 439 - 450.
- Piek T and Spanjer W, 1986. Chemistry and pharmacology of solitary wasp venoms. In *Venom of the Hymenoptera*

- (ed. T. Piek), Academic press, London. Pp. 161 - 307.
- Piek T, (Ed.), 1986. Venoms of the Hymenoptera. London: Academic Press.
- Piek T, 1990. Neurotoxins from venoms of the Hymenoptera—twenty-five years of research in Amsterdam. *Com. Biochem. Physiol.* 96, 223 - 233.
- Possee R D, Cayley P J, Cory J S, Bishop D H L, 1993. Genetically engineered viral insecticides: new insecticides with improved phenotypes. *Pestic. Sci.* 39, 109 - 115.
- Pultz M A, Zimmerman K K, Alto N M, Kaeberlein M, *et al.*, 2000. A genetic screen for zygotic embryonic lethal mutations affecting cuticular morphology in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 154, 1213.
- Quicke D L J, Fitton M G and Ingram S, 1992. Phylogenetic implications of the structure and distribution of ovipositor valvelli in the Hymenoptera (Insecta). *J. Nat. Hist.* 26, 587 - 608.
- Quistad G B, Nguyen Q, Bernasconi P, *et al.*, 1994. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 955 - 961.
- Rahbé Y, Digilio M C, Febvay G, Guillaud J, Fanti P, Pennacchio F, 2002. Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. *J. Insect Physiol.* 48, 507 - 516.
- Ratcliff N A and Rowley A F, 1987. Insect responses to parasites and other pathogens. In "Immune Responses In Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, Immunoprophylaxis" (E J L Soulsby, Ed.), pp. 271-332. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Ratcliffe N A, King P E, 1969. Morphological, ultrastructural, histochemical and electrophoretic studies on the venom system of *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Morphol.* 127, 177 - 204.
- Reed D A, Beckage N E, 1997. Inhibition of testicular growth and development in *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *J. Insect Physiol.* 43, 29 - 38.
- Regev A, Rivkin H, Inceoglu B, Gershburg E, Hammock B D, Gurevitz M, Chejanovsky N, 2003. Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett.* 537, 103 - 107.
- Richard E H and Parkinson N M, 2000. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 33 - 42.
- Richards E H, Edwards J P, 1999 a. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis* effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes. *J. Insect Physiol.* 45, 1073 - 1083.
- Richards E H, Edwards J P, 2000 a. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. *Com. Biochem. Physiol.* 127 B, 289 - 298.
- Richards E H, Edwards J P, 1999 b. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, noctuidae) by the ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis*, results in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host Plasma. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29, 557 - 569.
- Richards E H, Edwards J P, 2000 b. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte mediated recognition of non-self and phagocytosis. *J. Insect Physiol.* 46, 1 - 11.
- Rinehart J P, Denlinger D L, 2002. Upregulation of transcripts encoding select heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* in response to venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 62 - 63.
- Rivero A, Balloux F, West S A, 2003. Testing for epistasis between deleterious mutations in a parasitoid

- wasp. *Evolution* 57, 1698.
- Rivers D B, 2004. Evaluation of host responses to envenomation as a means to assess ectoparasitic pteromalid wasp's potential for controlling manure-breeding flies. *Biol. Control* 30, 181 - 192.
- Rivers D B, Denlinger D L, 1995 a. Venom-induced alterations in fly lipid metabolism and its impact on larval development of the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Invertebr. Pathol.* 66, 104 - 110.
- Rivers D B, Denlinger D L, 1994. Developmental fate of the flesh fly, *Sarcophaga bullata* (Diptera: Sarcophagidae), envenomated by the pupal ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Insect Physiol.* 40, 121 - 127.
- Rivers D B, Denlinger D L, 1995 b. Fecundity and development of the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* are dependent on host quality. *Entomol. Exp. Appl.* 76, 15 - 24.
- Rivers D B, Genco M, Sanchez R A, 1999. In vitro analysis of venom from the wasp *Nasonia vitripennis*: susceptibility of different cell lines and venom-induced changes in plasma membrane permeability. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* 35, 102 - 110.
- Rivers D B, Hink W F, Denlinger D L, 1993. Toxicity of the venom from *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward fly hosts, nontarget insects, different developmental stages, and cultured insect cells. *Toxicon* 31, 755 - 765.
- Rivers D B, Ruggiero L, Hayes M, 2002. The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *J. Insect Physiol.* 48, 1053 - 1064.
- Rizki R M and Rizki T M, 1990. Parasitoid virus -like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8388 - 8392.
- Rizki R M and Rizki T M, 1991. Effects of lamelloglysin from a parasitoid wasp on *Drosophila* blood cells *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 257, 236 - 244.
- Rizki T M, Rizki R M, 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *L. bouvardi*. *Develop. Comp. Immunol.* 16, 103 - 110.
- Rizki T M, Rizki R M, 1994. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 41.
- Robertson P L, 1968. A morphological and functional study of the venom apparatus in representatives of some major groups of Hymenoptera. *Aust. J. Zool.* 16, 163 - 166.
- Russo J, Brehélin M, Carton Y, 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. *J. Insect Physiol.* 47, 167 - 172.
- Schmidt J O and Blum M S, 1978 a. Harvester ant venom: chemistry and pharmacology. *Science* 200, 1064.
- Schmidt J O and Blum M S, 1978 b. The biochemical constituents of the venom of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *Comp. Biochem. Physiol.* 61C, 239.
- Schmidt J O, 1982. Biochemistry of insect venoms. *Ann. Rev. Entomol.* 27, 339.
- Schmidt J O, 1986. Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. In: *Venoms of the Hymenoptera*. P. 425 (Piek T, Ed.). London: Academic Press.
- Schmidt J O, Blum M S, Overal W L, 1986. Comparative enzymology of venom from sting Hymenoptera. *Toxicon* 24, 907 - 921.
- Shelby K S, Adeyeye O A, Okot-Kotber B M, Webb B A, 2000. Parasitism-linked block of host plasma melanization. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 218 - 225.
- Shelby K S, Webb B A, 1994. Polydnavirus infection inhibits synthesis of a insect plasma protein, arylphorin. *J. Gen. Virol.* 75, 2285 - 2292.

- Shelby K S, Webb B A, 1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 263 - 270.
- Shelby K S, Webb B A, 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *J. Insect Physiol.* 45, 507 - 514.
- Shimizu T, Ttsuki Y and Takeda N, 1993. Aromatic amino acid in the venom of braconid parasitoid, *Apanteles kariyai*. *Z. Naturforsch. C* 48, 108 - 109.
- Shuker D M, Reece S E, Taylor J A L, West S A, 2004. Wasp sex ratios when females on a patch are related. *Anim. Behav.* 68, 331.
- Shuker D M, West S A, 2004. Information constraints and the precision of adaptation: Sex ration manipulation in wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10363.
- Skinner W S, Dennis P A and Quistad G B, 1990. Partial characterization of toxins from *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae). *J. Econ. Entomol.* 83, 733 - 736.
- Slavnova T I, Antonov S M, Magazanik L G, *et al.*, 1989. Effect of toxin form the venom of the ichneumon *Habrobracon hebetor* (Say) on neuromuscular transmission in insects. *Bio. Sci.* 43, 684 - 686.
- Spanjer W Grosu L and Piek T, 1977. Two different paralyzing preparations obtained from a homogenate of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Toxicon* 15, 413 - 421.
- Steiner B, Pfister-Wilhelm R, Grossniklaus-Bürgin C, Rembold H, Treiblmayr K, Lanzrein B, 1999. Titres of juvenile hormone I, II and III in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) from the egg to the pupal moult and their modification by the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae). *J. Insect Physiol.* 45, 401 - 413.
- Stoltz D B Guzo D, Belland E R, Lucarotti C J and McKinnon E A, 1988. Venom promotes uncoating in vitro and persistence in vivo of DNA from braconid polydnavirus. *J. Gen. Virol.* 69, 903 - 907.
- Strand M R, Dover B A, 1991. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 18, 131 - 145.
- Strand M R, Johnson J A, Noda T and Dover B A, 1994. Developmental and characterization of monoclonal antibodies to venom of the parasitoid *Microplitis demolitor*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 123 - 136.
- Strand M R, Noda T, 1991. Alterations in hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *J. Insect Physiol.* 37, 479 - 481.
- Strand M R, Pech L L, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Ann. Rev. Entomol.* 40, 31 - 56.
- Tada M, Aizawa T, Shinohara Y, Matsubara K, Miura K, Yoshida M, Shitara K, Kouno T, Mizuguchi M, Nitta K, Hayakawa Y, and Kawano K, 2003. Roles of aromatic residues in the structure and biological activity of the small cytokine, growth-blocking peptide (GBP). *J. Biol. Chem.* 278, 10778 - 10783.
- Tagashira E, Tanaka T, 1998. Parasitic castration of *Pseudaletia separata* by *Cotesia kariyai* and its association with polydnavirus gene expression. *J. Insect Physiol.* 44, 733 - 744.
- Tanaka T, 1987 a. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. *J. Insect Physiol.* 33, 413 - 420.
- Tanaka T, 1987 b. Morphological changes in hemocytes of the host *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 57 - 67.
- Tanaka T, Agui N, Hiruma K, 1987. The parasite *Apanteles kariyai* inhibits pupation of its host, *Pseudaletia separata*, via disruption of prothoracicotropic hormone release. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 364 - 374.
- Tanaka T, Tagashira E, Sakurai S, 1994. Reduction of testis growth of *Pseudaletia separata* larvae after parasitization by *Cotesia kariyai*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 111 - 122.
- Tanaka T, Vinson S B, 1991. Interaction of venoms with the calyx fluids of three parasitoids *Cardiochiles nigriceps*: *Microplitis croceipes* (Hym.: Braconidae) and *Camponotus sonorensis* (Hym.: Ichneumonidae), in effecting a

- delay in pupation of *Heliothis virescens* (Lep: Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 84, 87 - 92.
- Thompson S N & Dahlman D L, 1998. Aberrant nutritional regulation of carbohydrate synthesis by parasitized *Manduca sexta* L. J. Insect Physiol. 44, 745 - 753.
- Thompson S N, 1982 a. Effects of parasitization by the insect parasite *Hyposoter exiguae* on the growth, development and physiology of its host *Trichoplusia ni*. Parasitol. 84, 491 - 510.
- Thompson S N, 1982 b. Effects of the insect parasite, *Hyposoter exiguae* on the total body glycogen and lipid levels of its hosts, *Trichoplusia ni*. Comp. Biochem. Physiol. 72 B, 233 - 237.
- Thompson S N, 1983. Biochemical and physiological effects of metazoan endoparasites on their host species. Comp. Biochem. Physiol. 74 B, 183 - 211.
- Thompson S N, 1986. Effects of the insect parasite *Hyposoter exiguae* (Viereck) on the carbohydrate metabolism of its host, *Trichoplusia ni*. (Hübner). J. Insect Physiol. 32, 287 - 293.
- Thompson S N, 1986. Nutrition and in vitro culture of insect parasitoids. Ann. Rev. Entomol. 31, 197 - 219.
- Thompson S N, 1999. Nutrition and culture of entomophagous insects. Ann. Rev. Entomol. 44, 561 - 592.
- Thompson S N, 2001. Parasitism enhances the induction of gluconeogenesis by the insect, *Manduca sexta* L. In. J. Biochem. Cell Biol. 33, 163 - 173.
- Thompson S N, 1993. Redirection of host metabolism and effects on parasite nutrition. In: Beckage, N.E., Thompson, S N, Federici, B A (Eds.), Parasites and Pathogens of Insects. Vol. 1 Parasites. Academic Press, New York, pp. 12 - 144.
- Togashi I, 1963. A comparative morphology of the poison gland in the adults of Ichneumon-flies (Hym., Ichneumonidae) (I). Kontyû 31, 297 - 304 (in Japanese with and English summary).
- Trabalon M, Plateaux L, Péru L, Bagnères A G, Hartmann N, 2000. Modification of morphological characters and cuticular compounds in worker ants *Leptothorax nylanderi* induced by endoparasites *Anomotaenia brevis*. J. Insect Physiol. 46, 169 - 178.
- Tram U, Sullivan W, 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. Science 296, 1124.
- Tu A T, 1977. Venoms chemistry and Molecular Biology. New York: Wiley.
- Uematsu H & Sakanoshita A, 1987. Effects of venom from external parasitoid, *Euplectrus kuwanae* (Hymenoptera: Eulophidae) on larval ecdysis of *Argyrogramma albostrata* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Ent. Zool. 22, 139 - 144.
- van Marle J, 1977. Structure and histochemistry of the venom glands of wasps *Microbracon hebetor* Say and *Philaenus triangulum* F. Toxicon 15, 529 - 539.
- Vass E, Nappi A J, 2000. Developmental and immunological aspects of *Drosophila*-parasitoid relationships. J. Parasitol. 86, 1259 - 1270.
- Veiga S S, da Silveira R B, Dreyfuss J L, Pereira J L, Haoacha J, Pereira A M, Mangili O C, Gremisio W, 2000. Identification of high molecular weight serine- proteases in *Loxosceles intermedia* (brownspider) venom. Toxicon 38, 825 - 839.
- Villagra C A, Ramirez, Niemeyer H M, 2002. Antipredator responses of aphids to parasitoids change as a function of aphid physiological state. Anim. Behav. 64, 677 - 683.
- Vinson S B, 1971. Defense reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiophiles nigriceps*. J. Invertebr. Pathol. 18, 94 - 100.
- Vinson S B, 1990. Physiological interactions between the host genus *Heliothis* and its guild of parasitoids. Arch. Insect Biochem. Physiol. 13, 63 - 81.
- Vinson S B, Pennacchio F, Lanzrein B, 1998. Interaction between parasitoids and their hosts: an introduction and perspective. J. Insect Physiol. 44, 701 - 702.
- Visser B J, Labruyère W T, Spanjer W and Piek T, 1983. Characterization of two paralyzing toxins (A-MTX and

- B-MTX), isolated from homogenate of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). Comp. Biochem. Physiol. 75 B, 523 - 538.
- Wago H, Kitano H, 1985. Effects of the venom from *Apanteles glomeratus* on the hemocytes and hemolymph of *Pieris rapae crucivora*. Appl. Entomol. Zool. 20, 103 - 110.
- Waller J B, 1965. The effect of venom of *Bracon hebetor* on the respiration of wax moth *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 11, 1595 - 1599.
- Wani M, Yagi S, Tanaka T, 1990. Synergistic effect of venom, calyx and teratocytes of *Apanteles kariyai* on the inhibition of larval pupal ecdysis of the host, *Pseudaletia separata*. Entomol. Exp. Appl. 57, 101 - 104.
- Weaver R J, Marris G C, Bell J, Edwards J P, 2000. Identity and mode of action of host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. Comp. Biochem. Physiol. 126 B, S101.
- Webb B A, Luchart S, 1994. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 26, 147 - 163.
- Webb B A, Summers M D, 1990. Venom and viral expression products of endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4961 - 4965.
- Werren J H, Minnot M-J P, 1999. An antennapedia-like mutation in *Nasonia vitripennis*. J. Heredity 90, 319 - 320.
- Werren J H, Nur U, Eickbush D, 1987. An extrachromosomal factor causing loss of paternal chromosomes. Nature 327, 75.
- Werren J H, Skinner S W, Huger A M, 1986. Male-killing bacteria in a parasitic wasp. Science 231, 990.
- Willers D and Lehmann-Danzinger H, 1984. Survival of endo-parasitic Hymenoptera in pupae of Lepidoptera by inhibition of phenoloxidase. Zeitschr. Parasitenkunde 70, 403 - 414.
- Yu X Q, Jiang H, Wang Y, Kanost M R, 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Molec. Biol. 33, 197 - 208.
- Zhang D, Dahlman D L, Järlfors U E, 1997. Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. J. Insect Physiol. 43, 577 - 585.
- Zhang G, Lu Z Q, Jiang H, Asgari S, 2004 a. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. Insect Biochem. Molec. Biol. 34, 477 - 483.
- Zhang G, Schmidt O, Asgari S, 2004 b. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. J. Biol. Chem. 279, 41580 - 41585.

第四部分 附 录

附录 博士生期间发表文章

发表和待发论文

Zhong Zhang, Gong-yin Ye, Jun Cai, Cui Hu. Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* toward the hemocytes of their nature hosts, non-target insects and cultured insect cell. *Toxicon* (接受, 待发表, SCI).

张忠, 蔡峻, 王洪祥, 叶恭银, 胡萃. 蝶蛹金小蜂寄生对两种寄主血细胞数量、形态及存活的影响. *植物保护学报* (接受, 待发表).

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)* 31, 71 - 75.

张忠, 叶恭银, 胡萃, 2004. 两种金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展、存活及包囊作用的影响. *昆虫学报*, 47, 551 - 561.

张忠, 叶恭银, 胡萃, 2003. 雪花莲凝集素抗虫作用研究进展. *中国生物防治*, 19, 197 - 201.

会议论文与摘要

张忠, 叶恭银, 胡萃, 2005. 蝶蛹金小蜂寄生及其毒液对两种寄主血淋巴和脂肪体物质代谢的影响. 迈入二十一世纪的中国生物防治, 114.

叶恭银, 张忠, 胡萃, 2005. 蝶蛹金小蜂毒液的生化特性与生理功能. 迈入二十一世纪的中国生物防治, 113.

Zhang zhong, Cai jun, Ye Gong-yin, Hu cui, 2004. Characterization and function of the venom in a pupal-specific endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). 15th International Plant Protection Congress, Beijing, China. pp, 110.

Zhang zhong, Ye Gong-yin, Yao Peng-cheng, Lv Hui-ping, Sun meng, Hu Cui, 2004. Vitellogenesis and its hormonal regulation in a pupal-specific endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). 15th International Plant Protection Congress, Beijing, China. pp, 110.

Ye Gong-yin, Zhang zhong, Cai jun, Hu cui, 2004. Effects of venoms from two different species of pteromalid wasps on the spreading, viability and encapsulation capacity of *Pieris rapae* hemocytes. XXII International Congress of Entomology, Brisbane Queensland Australia. (光盘版, 文章编号: PS1S1320).

张忠, 叶恭银, 胡萃, 2002. 寄生蜂毒液生理功能研究进展. *中国昆虫学会 2002 年学术论文集*, 136 - 142.