

川硬皮肿腿蜂毒液对寄主黄粉虫蛹的影响 *

卓志航¹ 杨伟^{1**} 覃欢¹ 杨春平¹ 杨桦¹ 徐丹萍²

(¹四川农业大学林学院森林保护省级重点实验室, 四川雅安 625014; ²四川农业大学食品学院农产品加工及贮藏工程省级重点实验室, 四川雅安 625014)

摘要 为揭示川硬皮肿腿蜂寄生对寄主黄粉虫蛹的调控机制, 本文通过自然寄生和毒液注射等方法研究了寄生过程中蜂毒液的作用。结果表明: 对人工注射的蛹, 寄主被麻痹的程度与毒液注入量呈正相关, 恢复活动情况与毒液注入量呈负相关; 当人工注射毒液浓度为0.01 VRE时, 黄粉虫表现出可逆的轻微麻痹; 当浓度提高到0.2 VRE时, 黄粉虫蛹表现出不可逆的完全僵化。单独注射土壤菌液, 导致蛹大量死亡并出现大范围的黑化现象, 而注射毒液和土壤菌液混合物, 蛹的黑化作用发生延缓, 且死亡率显著下降。对毒液的抑菌测试表明, 毒液对金黄葡萄球菌的抑菌作用显著高于大肠杆菌。在一定温度范围内, 随着温度升高毒液麻痹活性显著降低, 对大肠杆菌抑菌性显著升高, 对金黄葡萄球菌抑菌性显著降低。表明川硬皮肿腿蜂毒液对寄主黄粉虫蛹具有麻痹、抑菌、抑制蜕皮和延缓黑化的作用。

关键词 川硬皮肿腿蜂 麻痹 抑菌 抑制黑化

文章编号 1001-9332(2013)11-3273-07 **中图分类号** S718.7 **文献标识码** A

Effects of venom from *Sclerodermus sichuanensis* Xiao on pupa of *Tenebrio molitor*. ZHUO Zhi-hang¹, YANG Wei¹, QIN Huan¹, YANG Chun-ping¹, YANG Hua¹, XU Dan-ping² (¹Sichuan Provincial Key Laboratory of Forest Protection, College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China; ²Sichuan Provincial Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Preservative, College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2013, 24(11): 3273–3279.

Abstract: To explore the regulatory mechanisms of parasitism of *Sclerodermus sichuanensis* on *Tenebrio molitor*, the methods of natural parasitism and venom injection were adopted to investigate the effects of the venom from *S. sichuanensis* on the pupa of *T. molitor* in the parasitic process. Under venom injection, the paralytic degree of the pupa had a positive correlation with the concentration of injected venom, and the number of recovered pupa had a negative correlation with the injected venom concentration. The *T. molitor* pupa was in slight and reversible paralysis when injected with 0.01 VRE (venom reservoir equivalent) of venom, and in non-reversible and complete paralysis when 0.2 VRE was injected. The pupa died massively and appeared a wide range of melanization when injected with soil bacterial suspension alone, but the melanization delayed and the mortality declined significantly when the mixed liquor of bacterium and venom was injected. The bacteriostasis of the venom on *Staphylococcus aureus* was significantly stronger than that on *Escherichia coli*. Within a definite range of temperature, the paralytic activity decreased significantly with increasing temperature, the bacteriostasis on *S. aureus* increased significantly, while that on *E. coli* was opposite. This study showed that the venom from *S. sichuanensis* had the effects of paralysis, bacteriostasis, inhibiting exuviations, and delaying melanization.

Key words: *Sclerodermus sichuanensis* Xiao; paralysis; bacteriostasis; melanization.

寄生蜂毒液具有调控寄主体液免疫、细胞免疫、生长发育、内分泌激素和营养代谢等功能^[1-5]。Barat等^[6]研究发现, 草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)被注射双斑瓢姬蜂(*Hyposoter didymator*)的PDV

* 四川省教育厅重点实验室专项(2006ZD011)、四川农业大学“211”工程双支计划项目(00370101)和四川农业大学长江上游生态林业工程建设项目建设资助。

** 通讯作者. E-mail: ywei0218@yahoo.com.cn

2013-05-02 收稿, 2013-08-29 接受.

(polydnavirus)后,酚氧化酶、酚氧化酶激活酶、丝氨酸蛋白酶等基因产生了差异表达;沙草粘虫(裹尸)薄茧小蜂(*Euplectrus* sp. near *plathypenae*)和粘虫盘绒茧蜂(*Cotesia kariyai*)毒液能减缓寄主的生长或抑制寄主化蛹^[7],但棉大卷螟甲腹茧蜂(*Chelonus inanitus*)毒液却能使寄主提前早熟变态^[8].另外,Tanaka 等^[9]研究发现,寄生蜂能通过破坏寄主前胸腺激素的释放来抑制寄主的化蛹;毒液不仅能抑制促前胸腺激素 PTTH 的分泌和合成,也能通过将蜕皮激素保持在较低水平来延缓寄主幼虫-蛹中间态的蜕皮^[10];Guerra 等^[11]研究发现,墨西哥棉铃象(*Anthonomus grandis*)的 3 龄幼虫被蜜茧蜂(*Bracon mellitor*)寄生后,体内自由氨基酸发生变化,出现 2 个自由氨基酸峰,而且自由氨基酸的上升总是与整体可溶蛋白的下降同步.对绝大多数不具多分 DNA 病毒和畸形细胞的寄生蜂而言,毒液是调控寄主生理最关键的因子^[12-13];内寄生蜂和外寄生蜂毒液对寄主免疫、营养、内分泌等方面都有调控作用,但大量研究发现外寄生蜂对毒液的依赖性高于内寄生蜂^[1,5,14-15].

川硬皮肿腿蜂(*Sclerodermus sichuanensis*)隶属于膜翅目(Hymenoptera)肿腿蜂科(Bethylidae),是松墨天牛(*Monochamus alternatus*)和杉棕天牛(*Calcidium villosulum*)等钻蛀性害虫的抑性外寄生蜂,能在寄生过程中永久性麻痹寄主^[16].川硬皮肿腿蜂雌蜂生殖系统较简单,毒囊体积所占比例大,无明显萼区,可见毒液在川硬皮肿腿蜂和寄主昆虫相互关系中起重要作用^[17].目前,对川硬皮肿腿蜂毒液的研究主要围绕在对寄主生理生化的影响等方面,而对蜂毒的麻痹作用、抑菌作用以及延缓黑化作用的报道相对较少,本文将从这些方面对川硬皮肿腿蜂毒液作用进行研究.

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试川硬皮肿腿蜂为四川农业大学森林保护省級重点实验室用黄粉虫(*Tenebrio molitor*)蛹繁殖的成年雌蜂,其子代雌蜂羽化 6 d 后(已完成交配)用于试验.供试寄主黄粉虫用麦麸和无污染蔬菜饲养,试验前已在实验室繁殖多年,选择体质量在 0.1 ~ 0.15 g 的蛹用于试验.供试大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株由四川农业大学森林保护省級重点实验室提供.

1.2 供试材料前处理

雌蜂驯化:试验前将已交配雌蜂和黄粉虫蛹以 1 : 1 比例放入玻璃指形管(6 cm×1 cm)中让其熟悉向寄主注入毒液麻痹寄主的过程,若能在 3 h 内麻痹寄主,视为成功.此过程是为了避免雌蜂初次麻痹寄主所花时间过长,不能保持处理和对照组寄主蛹龄的一致性.

寄生试验:将成功驯化的雌蜂和黄粉虫蛹以 1 : 1 比例放入玻璃指形管(6 cm×1 cm)中,以脱脂棉封口,自然光培养,成功麻痹寄主 24 h 后记为第 1 天.

消毒灭菌:对解剖器械(镊子、解剖针等)、注射器械(微量进样器 20 μL)、PBS(0.80% NaCl, 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐, pH 7.0 ~ 7.2)、蒸馏水、去离子水等进行灭菌(115 Pa, 20 min);用棉球蘸 75% 酒精对黄粉虫腹部消毒.

1.3 毒液制备及单个毒囊蛋白含量测定

在解剖镜下用镊子拉出雌蜂产卵鞘,取毒囊并释放毒液至盛有 PBS 溶液、0 °C 冰水浴的 Eppendorf 管中, 10000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min (Allegra™ 64R Centrifuge),除去空毒囊和组织碎片,取上清液用于试验.

取 20 头蜂毒液对单个毒囊蛋白含量进行测定,测定方法为 Bradford 法^[18],标准曲线用牛血清蛋白进行测定,曲线范围 0 ~ 100 μg,试验重复 5 次.

1.4 毒液麻痹作用试验

1.4.1 自然蛰刺 在指形管中,按 1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1 和 5 : 1(成年雌蜂 : 黄粉虫蛹)分别接入 40 头黄粉虫蛹和雌蜂(每根指形管接入一头黄粉虫),脱脂棉封口,待寄主被雌蜂蛰刺麻痹后取出,置于(27±1) °C、85% RH 培养,12 h 后统计麻痹情况,24 h 后统计恢复活动蛹的数量,试验重复 3 次.

1.4.2 注射毒液 取制备好的毒液用 PBS 稀释成 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 和 0.3 VRE(1 个毒囊中的毒液溶入 1 μL PBS 认定为 1 VRE),将稀释好的毒液对黄粉虫蛹进行腹部注射(1 μL · 头⁻¹),每个浓度注射蛹 40 头,以注射 PBS 为对照,注射后置于(27±1) °C、85% RH 培养,12 h 后统计麻痹情况,24 h 后统计恢复活动蛹的数量,试验重复 3 次.

1.4.3 麻痹标准 麻痹程度分为轻微麻痹、完全麻痹和致死麻痹,其中轻微麻痹是指黄粉虫蛹受刺激后没有完全丧失活动能力,躯体尚能摆动,但是活动速度较缓慢,幅度较小、不灵活,并且这种麻痹作用是可逆的,24 h 后恢复活动与对照无差异;完全麻

痹是指对刺激完全没有反应, 完全僵化, 没有任何动作; 致死麻痹是指注射毒液后黄粉虫蛹不产生与轻微麻痹与完全麻痹相似的效果, 直接死亡。

1.4.4 毒液麻痹蛋白探索 取制备好的毒液加入蛋白酶K, 使之终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37 °C水浴2 h, 检测麻痹活性(参照1.4.2). 以不含毒液 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶K为阴性对照, 以未处理的毒液(0.01和0.3 VRE)为阳性对照, 分别检测毒液麻痹活性(参照1.4.2), 试验重复3次。

1.5 毒液抑菌作用试验

1.5.1 菌液、毒液及混合液制备 菌液: 称取10 g泥土于100 mL灭菌蒸馏水中, 充分混匀, 静置至澄清, 再用灭菌水稀释浓度至 $10^{-10} \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$. 选择菌液试验目的在于探讨毒液对细菌的抑制作用, 从而揭示黄粉虫蛹被寄生蜂麻痹取食时难以被细菌侵蚀腐坏的原因; 选择土壤菌液则是由于土壤中含有细菌种类繁多, 且符合黄粉虫蛹被麻痹取食时所处的细菌环境条件。毒液制备: 参照1.3、1.4.2, 毒液制备浓度为0.3和0.5 VRE. 毒液、菌液混合液: 解剖镜下取出毒囊溶于混合菌液中, 使其浓度为0.3 VRE.

1.5.2 菌液、毒液及混合液注射 试验组取160头蛹, 分别用微量进样器在腹部注射1 μL 毒液(0.01和0.3 VRE)、菌液和混合液, 对照组注射1 μL 灭菌蒸馏水和灭菌PBS, 置于(27 ± 1) °C、85% RH培养48 h后观察, 试验重复3次。

1.5.3 供试菌种活化 将用EP管于-20 °C保存的菌种取出, 放置于4 °C冰箱融化。用移液枪将融化后的1 mL菌液加入盛有100 mL灭菌牛肉膏蛋白胨液体培养基的锥形瓶中, 并放入恒温振荡培养箱内37 °C、100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行光照震荡培养, 24 h后取出备用。

1.5.4 菌悬液配制及平板抑菌试验 菌悬液配置: 菌种活化后以无菌液体培养基为空白于420 nm测OD值。大肠杆菌OD值约为5.5~6.0, 用灭菌蒸馏水稀释5000倍; 金黄葡萄球菌OD值约为4.0~

4.6, 稀释3000倍; 枯草芽孢杆菌OD值约为4.2~4.8, 稀释8000倍。

平板抑菌试验: 取配置好的菌悬液0.3 mL均匀涂布于固体牛肉膏蛋白胨平板培养基表面, 静置在无菌超净工作台中30 min. 取制备好的0.5 VRE毒液10 μL 滴入已灭菌的直径为6 mm的圆形滤纸片, 贴在已接种的平板内, 并以灭菌PBS和灭菌水为对照。将贴好纸片的培养皿, 于37 °C培养箱中光照倒置培养24 h, 观察有无抑菌圈并用直尺测量各抑菌圈的直径大小, 试验重复3次。

1.6 温度对毒液麻痹及抑菌作用的影响试验

取0.3 VRE毒液(参照1.3)、菌液(参照1.5.4), 分别于30、40、50、60、80和100 °C下处理5 min, 用于检测麻痹活性(参照1.4.2)和抑菌活性(参照1.5.4), 以不含毒液的不同温度处理的灭菌PBS和灭菌水为对照, 试验重复3次。

1.7 数据处理

试验数据均运用SPSS 18.0软件进行t检验、单因素方差(ANOVA)和Duncan系列分析。

2 结果与分析

2.1 单个毒囊蛋白含量

川硬皮肿腿蜂每个毒囊蛋白含量约为(3.078±0.351) μg , 浓度0.3 VRE蛋白含量约为(0.923±0.105) $\mu\text{g} \cdot \text{uL}^{-1}$.

2.2 毒液麻痹作用

2.2.1 自然蛰刺麻痹效果 寄主蛹被驯化后的雌蜂自然麻痹所需要的时间约为0.5~3 h, 麻痹后继续培养发现, 因接种成年雌蜂比例不同黄粉虫蛹麻痹程度不同, 接种比例越大, 蛹被蛰刺的次数与毒液的注入量越大。自然蛰刺的蛹, 寄主被麻痹的程度与接种比例呈正相关, 恢复活动情况与毒液注入量呈负相关。接种比例为1:1时, 蛹表现出轻微的麻痹, 且部分能显著恢复活动; 接种比例为1:2时, 完全麻痹状态显著升高, 轻微麻痹状态、恢复能力显著下降。

表1 不同比例(成年雌蜂比黄粉虫蛹)与麻痹状况的关系

Table 1 Relationships between different proportions (adult wasp to *Tenebrio molitor* pupa) and paralytic degree (mean±SD)

麻痹状况 Paralytic degree	成年雌蜂: 黄粉虫蛹 Adult wasp: <i>T. molitor</i> pupa				
	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
轻微麻痹 Slight paralysis (heads)	22.8±0.9Aa	13.7±0.3Ab	3.7±0.7Cc	3.0±0.6Cc	2.7±0.9Ac
完全麻痹 Complete paralysis (heads)	17.3±0.9Ba	26.3±0.3Bb	36.3±0.7Bc	37.0±0.6Bc	37.3±0.9Bc
恢复活动 Recovered pupa (heads)	14.3±0.7Ca	7.3±0.3Cb	1.0±0.6Ac	0.3±0.3Ac	0.7±0.7Ac

同列不同大写字母表示差异显著($P<0.05$) Different capital letters in the same column meant significant difference at 0.05 level. 同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$) Different small letters in the same row meant significant difference at 0.05 level. 下同 The same below.

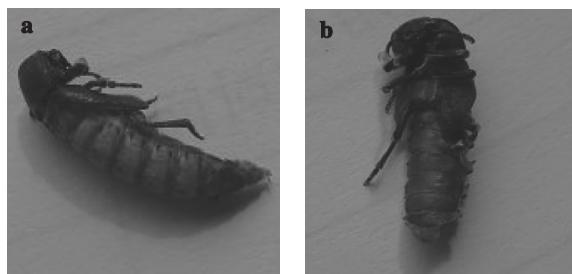


图1 黄粉虫蛹-成虫中间体

Fig.1 Pupa-imago transition state of *Tenebrio molitor*.

a)侧面 Profile; b)腹面 Ventral side.

($P<0.05$)；当接种比例达到1:3时，大量蛹被完全麻痹($P<0.05$)（表1）。部分被注入毒液量较少的蛹麻痹后可恢复活动，继续发育，至羽化时形成头部、翅和足部分发育，成为蜕皮障碍的蛹-成虫中间体（图1）；而被注入毒液量较大的蛹持续保持麻痹状态，至麻痹后8~14 d死亡（相同培养条件下正常蛹期为7~10 d）。

2.2.2 毒液注射麻痹效果 人工注射的蛹，寄主被麻痹的程度与毒液注入量呈正相关，恢复活动情况与毒液注入量呈负相关。注入0.01 VRE毒液的蛹表现出轻微的麻痹，且大部分能显著恢复活动，但随着毒液浓度增加，黄粉虫蛹逐渐表现出对刺激无反应的完全僵化迹象，且恢复活动能力随之减弱；当浓

度达到0.03 VRE时，完全麻痹状态显著升高，轻微麻痹状态、恢复能力显著下降；当浓度达到0.05 VRE时，大量蛹显著开始被完全麻痹；当浓度达到0.2 VRE时，麻痹状态开始不可恢复($P<0.05$)，使蛹表现完全僵化状态至死。人工注射的蛹在4~5 d后大量死亡（表2）。

2.2.3 毒液麻痹蛋白探索 蛋白酶K水解毒液后，黄粉虫蛹并没有表现出被麻痹的情况，与阴性对照（注射蛋白酶K）差异不显著，但与阳性对照（注射不同浓度毒液）差异显著($P<0.05$)（表3），证明毒液中具有麻痹活性的物质是蛋白质。

2.3 毒液抑菌作用

2.3.1 菌液、毒液及混合液注射 由表4可知，单独注射菌液后，大多数黄粉虫蛹24 h内出现死亡，且伴随着整个躯体泛黑，死亡率显著升高；注射0.3 VRE混合液后，黄粉虫蛹出现死亡并伴随整个躯体泛黑数目及死亡率显著下降；单独注射毒液的蛹48 h内陷入麻痹状态，只有少数出现死亡且不泛黑，但在注射后第4天缓慢泛黑并死亡。证明川硬皮肿腿蜂毒液具有抑菌活性，且能够抑制或延缓黑化作用。

2.3.2 平板抑菌试验 毒液对大肠杆菌和金黄葡萄球菌都有显著抑菌作用，且对金黄葡萄球菌抑菌作用显著高于大肠杆菌($P<0.05$)（表5）；由于灭菌

表2 注射不同浓度毒液后寄主麻痹状况

Table 2 Paralytic degree of host injected with different concentrations venom (mean±SD)

麻痹状况 Paralytic degree	PBS	0.01 VRE	0.03 VRE	0.05 VRE	0.1 VRE	0.2 VRE	0.3 VRE
轻微麻痹 Slight paralysis (heads)	0Ad	33.7±0.6Aa	18.7±0.3Ab	7.7±0.3Ac	7.3±0.7Ac	7.3±0.3Cc	7.3±0.7Cc
完全麻痹 Complete paralysis (heads)	0Ad	6.3±0.6Ba	21.3±0.3Ab	32.3±0.3Bc	32.7±0.7Bc	32.7±0.3Bc	32.7±0.7Bc
恢复活动 Recovered pupa (heads)	0Ad	29.0±1.2Ca	15.3±0.3Bb	9.3±0.3Cc	4.7±0.7Cb	0Ad	0Ad

表3 毒液麻痹蛋白探索

Table 3 Exploring paralytic protein in venom (mean±SD)

麻痹状况 Paralytic degree	阴性对照 Negative control	试验组 Experimental sample	阳性对照 Positive control	
			0.01 VRE	0.3 VRE
轻微麻痹 Slight paralysis (heads)	0Ab	0Ab	33.0±0.6Aa	7.3±0.7Cc
完全麻痹 Complete paralysis (heads)	0Ab	0Ab	4.3±0.9Ba	30.0±1.2Bc
恢复活动 Recovered pupa (heads)	0Ab	0Ab	29.0±1.2Ca	0Ab

表4 注射不同成分后黄粉虫蛹的反应

Table 4 Reaction of pupa after injected with different reagents (mean±SD)

死亡状况 Death status	菌液 Soil bacteria suspension	毒液 Venom		混合液 (0.3 VRE) Miscible liquid	灭菌蒸馏水 Sterile purified water	灭菌 PBS Sterile PBS
		0.01 VRE	0.3 VRE			
死亡且躯体泛黑数 Dead and melanized (heads)	34.7±0.3b	0c	0c	5.7±0.3a	0c	0c
死亡率 Death rate (%)	90.8±2.2a	5.8±0.8d	20.8±1.7b	19.2±0.8b	0c	0c

表 5 平板试验抑菌圈直径

Table 5 Diameters of inhibition zone of treadmill experiment (mm, mean±SD)

菌种 Bacterium	毒液 Venom (0.5 VRE)	灭菌 PBS Sterile PBS	灭菌蒸馏水 sterile water
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	7.7±0.3Bb	0Aa	0Aa
金黄葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	9.7±0.3Ab	0Aa	0Aa
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	8.7±0.3ABbc	8.3±0.7Bb	0Aa

PBS 对枯草芽孢杆菌存在抑菌作用,不能证明毒液对枯草芽孢杆菌是否存在抑菌作用.

2.4 温度对毒液麻痹及抑菌作用的影响

毒液的麻痹及抑菌活性在 30 和 40 ℃ 差异不显著, 40 ℃ 以后, 随着温度升高毒液麻痹活性显著降低, 直至 60 ℃ 麻痹活性消失; 对大肠杆菌的抑菌活性在 40 ℃ 后显著升高, 50 ℃ 以后没有显著变化; 对金黄葡萄球菌的抑菌活性在 60 ℃ 时显著降低, 之后随着温度升高抑菌活性消失(表 6).

表 6 温度对毒液麻痹与抑菌活性的影响

Table 6 Effects of temperature on venom paralysis and bacteriostasis (mean±SD)

温度 Temperature (℃)	麻痹数量 Paralytic number (heads)		抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)		
	毒液 Venom (0.3 VRE)	灭菌 PBS Sterile PBS	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	灭菌 PBS Sterile PBS
			灭菌 PBS Sterile PBS	灭菌 PBS Sterile PBS	灭菌 PBS Sterile PBS
30	36.0±3.0Ab	0Aa	7.7±0.3Aa	8.7±0.3Ac	0Ab
40	39.3±0.7Ab	0Aa	7.7±0.3Aa	8.7±0.3Ac	0Ab
50	19.0±0.6Bb	0Aa	9.7±0.3Ba	8.7±0.3Ac	0Ab
60	0.7±0.3Ca	0Aa	9.7±0.9Ba	6.7±0.3Bc	0Ab
80	0 Ca	0Aa	9.7±0.9Ba	0Cb	0Ab
100	0 Ca	0Aa	9.7±0.7Ba	0Cb	0Ab

3 讨 论

3.1 毒液的麻痹与抑制蜕皮作用

外寄生蜂毒液最为常见的功能有麻痹和抑制寄主蜕皮变态^[19-20], Kilincer^[21]早在 1975 年就发现黄痣黑瘤姬蜂 (*Pimpla turionellae*) 对大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 蛹具有麻痹、抑制黑化及致死作用, 而 Parkinson 和 Weaver^[22]对瘤姬蜂 (*P. hypochondriaca*) 毒液的研究也得到相似结果。川硬皮肿腿蜂是典型的抑性外寄生蜂, 其毒液的麻痹作用是寄生行为十分重要的一步, 只有使寄主活动能力减弱或丧失才能进行取食和体外消化, 为子代发育做准备, 而过早致死会导致寄主腐烂, 不利于寄生蜂寄生^[23]; 另外, 毒液的致死作用可能是对寄主免疫的一种调控方式, 因为死亡寄主的免疫应答将变得更少^[22]。

自然蛰刺和人工注射毒液试验显示: 寄主黄粉虫蛹对川硬皮肿腿蜂毒液有一定的抵抗力, 在低浓度(0.01 VRE)注入和自然蛰刺时, 麻痹作用是可逆的; 注入 0.01 VRE 毒液的寄主大部分可恢复活动, 但是在 3~8 d 内陆续死亡, 可能是注射处理对虫体伤害较大, 刺入时破坏了脂肪体组织。随着毒液注入浓度的升高轻微麻痹和恢复活动效果显著下降, 而完全麻痹效果显著升高, 说明寄主的麻痹程度与恢复状况与毒液浓度相关, 毒液浓度能够在不同水平

上调控和影响寄主免疫、内分泌、营养代谢等生理功能。部分自然蛰刺的寄主恢复活动后可以继续蛹期发育, 但是不能成功羽化, 蜕皮被抑制了, 可见川硬皮肿腿蜂毒液也有抑制寄主蜕皮的作用。对外寄生蜂毒液而言, 抑制寄主蜕皮变态是十分重要的, 因为其子代是依附于寄主体表生存, 寄主蜕皮受到抑制将有利于寄生蜂子代的生长发育^[9-10]。毒液抑制黄粉虫蛹蜕皮的机理尚不明确。但蜕皮激素作用的靶标是超气门蛋白 (ultraspiracle protein, USP), 可能与寄主血淋巴蛋白减少有关。另外, 这种寄生导致的蜕皮抑制也可能与蛰刺的物理伤害有关; 昆虫受到物理伤害时海藻糖浓度升高或糖降解速度变慢, 从而保持高血糖应对短时间内突然发生的意外, 进而为逃避或进攻行为的内环境保持最佳的活化状态, 这类情况被定义为海藻糖亢奋金属免疫 (hypertrehalosemia), 这时蛹期营养代谢的改变也可能造成羽化失败。贺张等^[24]研究发现, 外界温度和寄主温度均能影响寄生蜂生长发育, 而 Parkinson 和 Weaver^[22]研究了温度对毒液麻痹活性的影响, 结果表明, 毒液在 50 ℃ 也存在麻痹活性。本试验中毒液麻痹活性在 50 ℃ 以后显著降低, 当温度达到 60 ℃ 时活性丧失, 表明温度对毒液麻痹活性是有影响的, 且毒液的麻痹活性在 30 ℃ 和 40 ℃ 最适宜。另外, 温度对毒液的影响可能表现在对麻痹蛋白活性的影响

上,进而影响寄主各方面的生理功能。

3.2 毒液的抑菌与延缓黑化作用

对寄生蜂而言,寄主的免疫作用是成功寄生的一道障碍,不利于子代蜂发育^[25],但寄生蜂有多种分泌物对寄主免疫进行调控,例如多分 DNA 病毒^[26]和卵巢蛋白^[27]等。另外,昆虫免疫包括体液和细胞免疫,其中体液免疫涉及到调节抗菌肽、血淋巴凝结和一系列黑化酶的产生等。试验中注射菌液后,黄粉虫蛹死亡并整个躯体泛黑,从体壁颜色判断应该是启动了黑化反应;而菌液与毒液共注射结果表明,毒液能在 48 h 内延缓这种黑化反应,说明毒液具有延缓黑化作用的功能。关于寄生蜂毒液对寄主黑化作用的抑制已有大量报道,如瘤姬蜂毒液中的丝氨酸蛋白酶和寄主体内丝氨酸蛋白酶相互竞争与酚氧化酶原的结合位点,结果导致寄主酚氧化酶原活性不能正常启动,从而延缓寄主的黑化反应^[28];Asgari 等^[29]对微红盘绒茧蜂(*Cotesia rubecula*)研究也发现毒液中的丝氨酸蛋白酶类似物对寄主血淋巴的黑化有抑制作用;另外,有的寄生蜂在抑制寄主免疫的同时又以其他方式提高寄主对外界的适应能力,如杀虫剂的抗性等,以提高子代蜂的成活率。因此这种黑化反应的延缓作用可能涉及毒液的免疫作用(丝氨酸蛋白酶和酚氧化酶等)或者毒液对虫体抗菌作用的诱导(如抗菌肽)或者毒液的抗菌作用;但在毒液对蛹蛋白调控的试验中,蛹血淋巴电泳与对照相比并未有特异性蛋白产生,因此不大可能是毒液诱导抗菌肽的产生,具体机制需要进一步试验探明。

在抑性寄生过程中,寄生蜂抑制寄主的生长发育并以寄主为取食对象,多数情况是通过杀死寄主来达成的,但子代蜂发育需要一定的时间,这时既需要分解食物供自己和子代蜂取食又要防止食物腐化变质,抑菌作用就显得非常重要了^[23],正是由于抑菌作用才能为寄生蜂持续提供食物。对于毒液的抗菌活性,酈卫弟^[30]对颈双缘姬蜂(*Diadromus collaris*)研究发现蜂毒具有抗菌活性,这说明寄生蜂毒液中确实存在抗菌类物质。平板抑菌试验结果证明,0.5 VRE 毒液对大肠杆菌和金黄葡萄球菌均有抑制作用,但对金黄葡萄球菌抑制作用显著高于大肠杆菌;PBS 对枯草芽孢杆菌有抑制作用,因此这种方法不能鉴别毒液对枯草芽孢杆菌是否有抑菌作用。大肠杆菌和金黄葡萄球菌是革兰氏阴性菌与阳性菌的典型代表,毒液对它们抑制强度的差别可能与革兰氏阴阳菌的属性有关。具体需要进一步试验探索。另

外,温度对毒液抑菌作用试验证明,对大肠杆菌的抑菌活性在40℃后显著升高,以后没有显著变化,而对金黄葡萄球菌的抑菌作用在60℃时显著降低,之后随着温度升高抑菌活性消失,这可能是由于毒液耐高温程度不同或毒液中不同组分分别对两种菌产生抑制作用.本文对寄生蜂毒液的麻痹和抑菌作用以及延缓黑化做了研究,但也产生了很多疑问,后续研究将努力探讨解决这些问题.

参考文献

- [1] Nakamatsu Y, Tanaka T. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera; Noctuidae) host as a food resource. *Journal of Insect Physiology*, 2003, **49**: 149–159
 - [2] Nakamatsu Y, Tanaka T. Food resource use of hyper-parasitoid *Trichomalopsis apantelocetena* (Hymenoptera: Pteromalidae), an idiobiotic ectoparasitoid. *Annals of the Entomological Society of America*, 2004, **97**: 994–999
 - [3] Nguyen TTA, Boudreault S, Michaud D, et al. Proteomes of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* in its resistance and susceptibility responses to differently compatible parasitoids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, **38**: 730–739
 - [4] Suzuki M, Tanaka T. Development of *Meteorus pulchricornis* and regulation of its noctuid host, *Pseudaletia separata*. *Journal of Insect Physiology*, 2007, **53**: 1072–1078
 - [5] Zhu JY, Ye GY, Hu C. Venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*: An overview. *Psyche*, 2011, doi:10.1155/2011/520926
 - [6] Barat HM, Hilliou F, Jousset FX, et al. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. *BMC Genomics*, 2006, **7**: 1–20
 - [7] Beckage NE, Gelman DB. Wasp paprasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology*, 2004, **49**: 299–330
 - [8] Peenacchio F, Strand MR. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 2006, **51**: 233–258
 - [9] Tanaka T, Agui N, Hiruma K. The parasitoid *Apanteles kariyai* inhibits pupation of its host, *Pseudaletia separata*, via disruption of prothoracicotropic hormone release. *General and Comparative Endocrinology*, 1987, **67**: 364–374
 - [10] Bernhard S, Rita PW, Christa GB, et al. Titres de juvénile hormone I, II et III in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) from the egg to the pupal moult and their modification by the egg-larval parasitoid *Chelonus inanis*

- tus (Braconidae). *Journal of Insect Physiology*, 1999, **45**: 401–413
- [11] Guerra AA, Robacker KM, Martinez S. Free amino acid and protein titers in *Anthonomus grandis* larvae venomized by *Bracon mellitor*. *Entomophaga*, 1993, **38**: 519–525
- [12] Cai J, Ye GY, Hu C. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus luspuparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): Effects of parasitization and venom on host hemocytes. *Journal of Insect Physiology*, 2004, **50**: 315–322
- [13] Li W-D (鄒卫弟), Huang F (黄 芳), Chen Y-F (陈亚锋), et al. Immunosuppression effects of venom of pupal endoparasitoid wasp, *Diadromus collaris* (Gravenhorst) on its host, *Plutella xylostella* pupae. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2006, **49**(2): 206–212 (in Chinese)
- [14] Deyrup LD, Matthews RW. A simple technique for milking the venom of a small parasitic wasp, *Melittobia digitata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Toxicon*, 2003, **42**: 217–218
- [15] Rivers DB, Crawley T, Bauser H. Localization of intracellular calcium release in cells injured by venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) and dependence of calcium mobilization on G-protein activation. *Journal of Insect Physiology*, 2005, **51**: 149–160
- [16] Zhou Z-J (周祖基), Yang W (杨 伟), Zeng C-H (曾垂惠), et al. A preliminary study on the bionomics of *Scleroderma sichuanensis* (Hymenoptera, Bethylidae). *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 1997, **33**(5): 475–480 (in Chinese)
- [17] Jiang X-J (蒋学建), Zhou Z-J (周祖基). Research on the female reproductive system of *Scleroderma sichuanensis* Xiao (Hymenoptera: Bethylidae). *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences)* (南京林业大学学报·自然科学版), 2006, **30**(5): 95–97 (in Chinese)
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254
- [19] Douy G, Rojas RD, Periquet G. Ability of *Eupelmus orientalis* ectoparasitoid larvae to develop on an unparasitised host in the absence of female stinging behavior. *Journal of Insect Physiology*, 1995, **41**: 287–296
- [20] Weaver RJ, Marrs GC, Olieff S, et al. Role of ectoparasitoid venom in the regulation of haemolymph ecdysteroid titres in a host noctuid moth. *Insect Biochemistry and Physiology*, 1997, **35**: 169–178
- [21] Kilincer N. Studies on the defensive reactions of *Galleria mellonella* L. pupa (Lepidoptera) and inhibitions of parasitic wasp *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae). *Journal of Applied Entomology*, 1975, **78**: 340–370
- [22] Parkinson NM, Weaver RJ. Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, **73**: 74–83
- [23] Bradleigh VS, Iwantsch GF. Host regulation by insect parasitoids. *The Quarterly Review of Biology*, 1980, **55**: 143–165
- [24] He Z (贺 张), Liu J-B (刘继兵), Chen Y-L (陈永玲), et al. Effects of different methods of housefly pupa for the reproduction of *Pachycyrepoideus vindemmiae* Rondani. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2013, **24**(3): 795–800 (in Chinese)
- [25] Salt G. Experimental studies in insect parasitism. XII. The reactions of six exopterygote insects to an alien parasite. *Journal of Insect Physiology*, 1963, **9**: 647–650
- [26] Vinson SB, Scott JR. Particles containing DNA associated with the oocyte of an insect parasitoid. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1975, **25**: 375–378
- [27] Webb BA, Luckhart S. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. *Journal of Insect Physiology*, 1996, **42**: 33–40
- [28] Marrs GC, Bell HA, Naylor JM, et al. The role of *Pimpla hypochondriaca* venom in the suppression of pupal noctuid host immunity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999, **93**: 291–298
- [29] Asgari S, Zhang GM, Zareie R, et al. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **33**: 1017–1024
- [30] Li W-D (鄒卫弟). Physiological Regulation of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) by *Diadromus collaris* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). PhD Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2005 (in Chinese)

作者简介 卓志航,男,1989年生,硕士研究生。主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究。E-mail: zhihangzhuo@gmail.com

责任编辑 肖 红