

柑橘凤蝶滞育期间水溶性蛋白初步研究

易传辉^{1,2}, 陈晓鸣^{1*}, 史军义¹, 周成理¹

(1. 中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 国家林业局 资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224;
2. 云南林业职业技术学院, 应用生态与职业教育研究所, 云南 昆明 650224)

摘 要:为深入了解柑橘凤蝶滞育机理, 利用毛细管区带电泳对滞育期间蛋白质特征进行了研究。电泳结果显示, 滞育期间蛋白质吸收峰在 18~45 个之间, 除 10 月下旬为 18 个最少和 12 月下旬为 45 最多外, 其余时期相近, 在 22~24 个之间, 同时, 不同时期蛋白质吸收峰在面积和迁移时间上存在差异。结果表明, 滞育期间进行着一定程度的蛋白质代谢, 种类、数量和含量发生了变化。12 月下旬蛋白质种类和数量明显增加, 含量也有所变化, 与气温下降抗冻蛋白产生有关。滞育期间蛋白质特征与非滞育蛹和滞育蛹羽化成虫有明显差异, 表明滞育期间有着与其他发育阶段不同的生命特征。

关键词:柑橘凤蝶; 蛋白质; 滞育; 蛹; 毛细管区带电泳

中图分类号:S763.42 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2010)05-0102-06

A Preliminary Study on Water-soluble Portein of Diapause-pupae of *Papilio xuthus*

YI Chuan-hui^{1,2}, CHEN Xiao-ming^{1*}, SHI Jun-yi¹, ZHOU Cheng-li¹

(1 Research Institute of Resources Insects, CAF; Key Laboratory of Resource Insect Cultivation and Utilization, State Forestry Administration, Kunming, Yunnan 650224, China; 2. Institute of Applied Ecology and Vocational Education, Yunnan Forestry Vocational College, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: The water-soluble protein of the butterfly, *Papilio xuthus* was analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE). The results as follow: there were 18~45 electropherograms absorb peaks during the stage of diapause, in which the minimum peak number occurred in the last ten days of October (18), and the maximum one was in the last ten days of December (45), there were little difference in other stages: within 22 to 24. And at the same time, the areas and migration time of absorb peaks were different, indicating that the protein had some degree metabolism during the stage of diapause, the kinds, numbers and content of protein changed in some degrees. The kinds and numbers of protein rised, and the content changed due to some antifrozen proteins were formed to adapt low temperature during the last ten days of December. Comparing with the stage of non-diapause pupae and the adult eclosion from diapause pupae, the characteristics of protein during the diapause pupae were different obviously, indicating different characteristics of life at the stage of diapause from other stages.

Key words: *Papilio xuthus*; diapause; protein; pupae; capillary zone electrophoresis

滞育是昆虫机体从直接发育进程中转入一种深层次陈代谢路线中断的发育暂停阶段。滞育期间,

收稿日期:2009-09-17 修回日期:2009-10-29
基金项目:国家林业局引进国际先进林业科学技术计划项目(2005-4-59);国家林业局引进国际先进林业科学技术计划项目(2008-4-68)。
作者简介:易传辉,男,副教授,博士。主要从事昆虫生态、观赏昆虫培育与利用研究。E-mail:ynkcx2007@163.com
* 通讯作者:陈晓鸣,男,研究员,博士生导师,主要从事资源昆虫学研究。

昆虫体内蛋白质、脂肪和核酸等化学成份含量发生了明显变化,并伴随着抗冻蛋白等滞育关联特异物质产生,滞育期间生理生化变化已在许多昆虫中进行了研究^[1-5]。在蝴蝶滞育生化方面研究相对较少,主要研究集中在脂肪含量、酶和激素等方面^[6]。毛细管电泳是近年来分析化学领域发展最快的新技术之一,具有灵敏度高,需要样品量少、成本低、模式多、分离范围广等优点,广泛应用于蛋白质、核酸、糖及其缀合物、手性、小离子与大细胞等分析^[7-11]。毛细管电泳技术应用于蛋白质昆虫研究的较少,仅见姜人春^[12]等人对稻飞虱可溶性蛋白质的初步分析,孙萌^[13]等对螟长距茧蜂等可溶性蛋白组成与卵黄蛋白的分析。柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*)属鳞翅目(Lepidoptera)凤蝶科(Papilionidae)昆虫,分布遍及全国各地,国外遍布东南亚、南亚以及日本、澳大利亚等地。对柑橘凤蝶的研究报道主要涉及习性、形态特征、生活史、滞育等^[14-20],易传辉^[21-23]等人对滞育期间的蛋白质含量等进行了研究,未见利用毛细管电泳对滞育期间蛋白质进行分析的研究。蛋白质在昆虫滞育期间具有重要作用^[23-26],利用毛细管电泳技术对柑橘凤蝶滞育期间蛋白质进行分析,有利于进一步揭示其滞育机理。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中所用柑橘凤蝶越冬滞育蛹,为四川峨眉(乐山市农科所内)人工养殖同一批滞育蛹,化蛹时间相近(9月中旬左右)。非滞育蛹为中国林业科学院资源昆虫所(昆明)内养殖。

1.2 方法

- (1) 样品处理 取样各 2 只(雌雄各 1 只),加入少许石英砂,2 mL 重蒸馏水磨细,再用 5 mL 重蒸馏水冲洗,合并。4℃ 下 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 过滤膜过滤后,待用。
- (2) 电泳系统 毛细管电泳系统,二级管阵列检测器(贝克曼公司生产);毛细管有效长度为 50 cm,石英毛细管内径为 $50\text{ }\mu\text{m}$;所有试剂均为分析纯。
- (3) 电泳条件 电泳缓冲溶液为 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液(pH 为 9.0),电压为 25 kV,温度为 25℃;紫外检测波长为 280 nm;开机后先用重蒸馏水冲洗 5 min,再用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 冲洗 5 min。进样前分别用重蒸馏水、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 和缓冲溶液各冲洗 3 min,第 2 次进样前重

复上次进样冲洗操作,进样 $3.5\text{ kPa}\times 5\text{ s}$,每个样品重复 1 次,电泳时间 20~30 min。试验表明,绝大多数蛋白吸收峰分布在迁移时间 20 min 以内,因此,试验结果中只分析 0~20 min 内的蛋白吸收峰。

2 结果与分析

2.1 越冬滞育蛹不同发育时期蛋白质变化

10 月下旬有 18 个蛋白质吸收峰。峰面积在 1% 以上的有 8 个,峰面积在 10% 以上的 2 个,分别为第 9 和 17 号峰,迁移时间分别为 7.775、16.663 min(图 1,表 1)。至 11 月下旬,蛋白质吸收峰增加至 22 个,但峰面积在 1% 以上的吸收峰有所减少,为 5 个,峰面积在 10% 以上的 2 个,分别为第 12 和 21 号峰,迁移时间分别为 7.638 min 和 16.525 min(图 2,表 1)。表明 10 月下旬至 11 月下旬期间蛋白质种类和含量有所变化,数量有所增加。至 12 月下旬蛋白质吸收峰快速增加至 45 个。峰面积在 1% 以上吸收峰也大幅度增加至 9 个,但峰面积在 10% 以上的减少为 1 个,为第 50 号峰,迁移时间为 17.892 min(图 3,表 1)。表明 12 月下旬蛋白质种类和数量有较大增加,这可能与气温下降产生抗冻蛋白质有关。1 月下旬吸收峰快速减少至 23 个。峰面积在 1% 以上的也略有减少,为 7 个,峰面积在 10% 以上的增加至 2 个,分别为第 14 和 22 号峰,迁移时间分别为 6.317 min 和 11.575 min,蛋白质种类和数量与 11 月下旬相近(图 4,表 1)。2 月下旬有 23 个蛋白质吸收峰。峰面积在 1% 以上的有 7 个,峰面积在 10% 以上的 1 个,为第 21 号峰,迁移时间为 13.188 min(图 5,表 1),蛋白质特征与 1 月下旬相近。3 月中旬有 23 个蛋白质吸收峰。峰面积在 1% 以上的有 7 个,峰面积在 10% 以上的 1 个,为第 19 号峰,迁移时间为 13.346 min(图 6,表 1)。在整个滞育期间,除 12 月下旬蛋白吸收峰从 11 月下旬的 22 个快速上升到 45 个,然后又快速下降到 1 月下旬的 23 个外,其余时期,蛋白质吸收峰数量变化不大,差异较小,12 月下旬吸收峰的快速增加可能与气温下降有关,低温下可能诱导柑橘凤蝶滞育蛹产生了多种与抗寒性有关的抗冻蛋白;不同时期蛋白质吸收面积和迁移时间分布具有一定差异。结果表明,在滞育期间仍进行着一定水平的蛋白质代谢,可能特别是与抗寒性有关的抗冻蛋白代谢活跃。

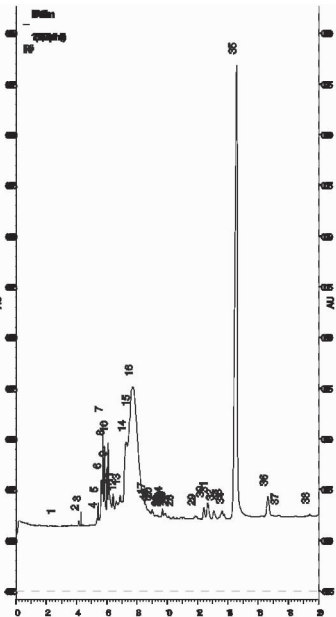


图 1 柑橘凤蝶越冬蛹 10 月下旬蛋白质电泳图

Fig. 1 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the last-ten days of Oct. of

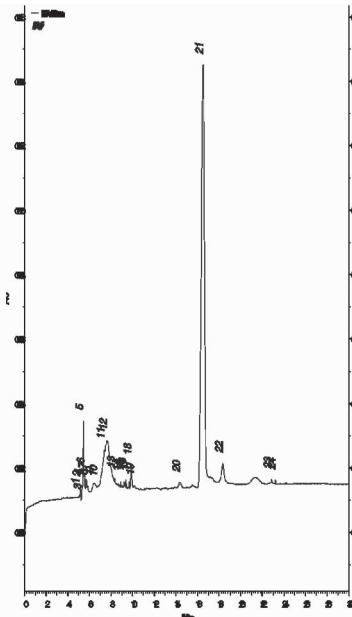


图 2 柑橘凤蝶越冬蛹 11 月下旬蛋白质电泳图

Fig. 2 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the last-ten days of Nov.

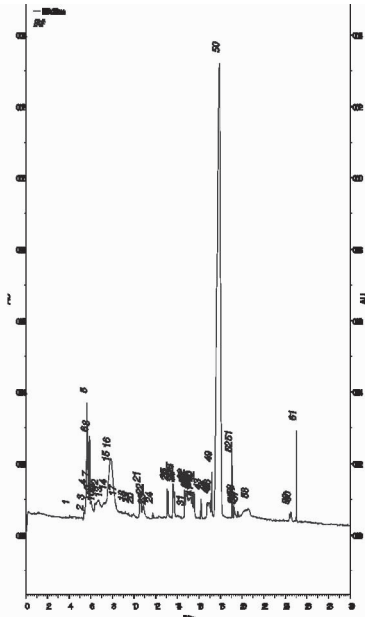


图 3 柑橘凤蝶越冬蛹 12 月下旬蛋白质电泳图

Fig. 3 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the last-ten days of Dec.

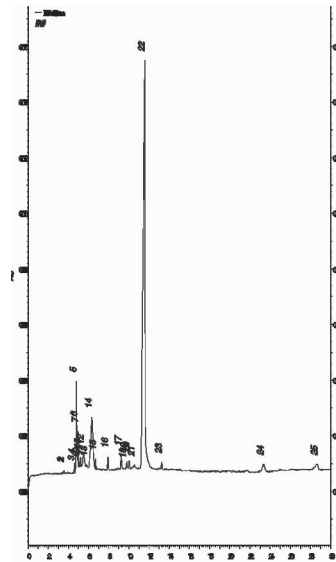


图 4 柑凤蝶越冬蛹 1 月下旬蛋白质电泳图

Fig. 4 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the last-ten day of Jan.

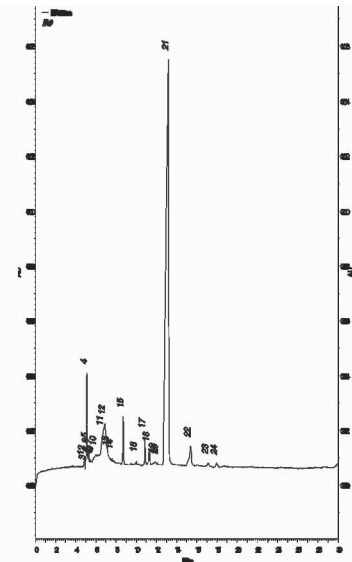


图 5 柑橘凤蝶越冬蛹 2 月下旬蛋白质电泳图

Fig. 5 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the last-ten days of Feb.

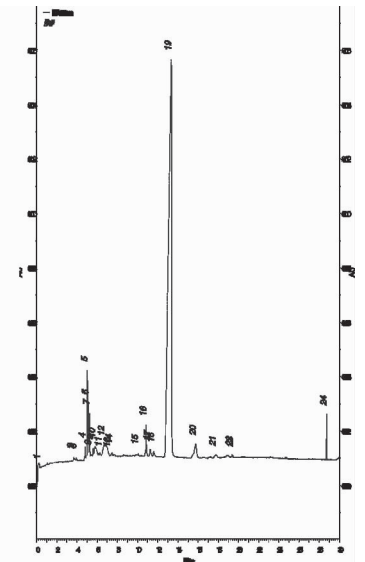


图 6 柑橘凤蝶越冬蛹 3 月中旬蛋白质电泳图

Fig. 6 Protein electropherograms of diapause pupae of *P. xuthus* in the first-ten days of Mar.

2.2 滞育期间蛋白质变化特征

2.2.1 非滞育蛹蛋白质特征 在化蛹初期,蛋白质吸收峰为 32 个,峰面积在 1% 以上的有 10 个,峰面积在 10% 以上的 2 个,分别为第 8 和 14 号峰,迁移时间分别为 5.425 min 和 7.454 min。后期吸收峰为 40 个,表明蛋白质种类在后期有所增加;峰面积在 1% 以上的峰数有所减少,仅为有 8 个,峰面积在

10% 上的也减少为 1 个,为第 34 号峰,迁移时间为 13.663 min。同时,化蛹初期和后期蛋白质吸收峰在迁移时间的分布上发生了较大变化,表明蛋白质种类发生了明显变化(图 7、图 8、表 1)。结果表明,从化蛹初期到羽化前夕的短时间内,非滞育蛹体内进行了活跃的蛋白质代谢,蛋白质种类和含量发生了明显改变。

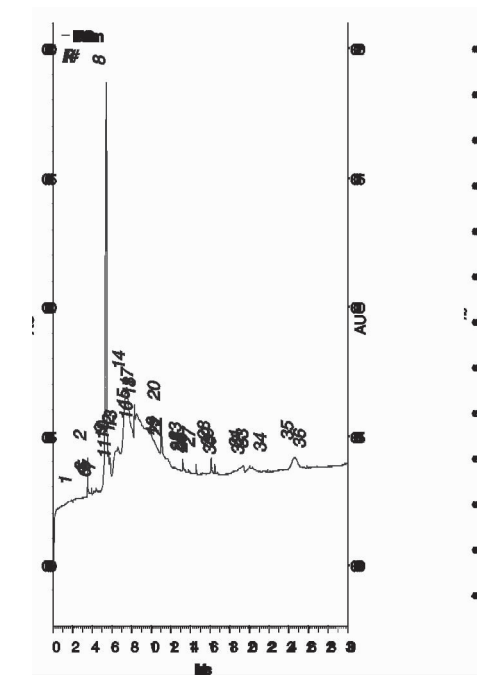


图 7 柑橘凤蝶非滞育蛹化
蛹初期蛋白质电泳图

Fig. 7 Protein electropherograms
of early nondiapause pupae of
P. xuthus

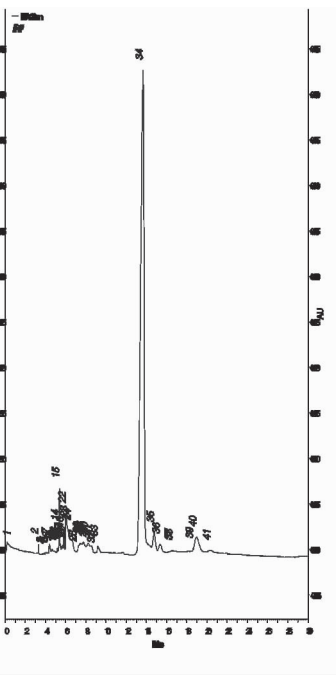


图 8 柑橘凤蝶非滞育蛹羽化
前夕蛋白质电泳图

Fig. 8 Protein electropherograms
of latter nondiapause pupae of
P. xuthus

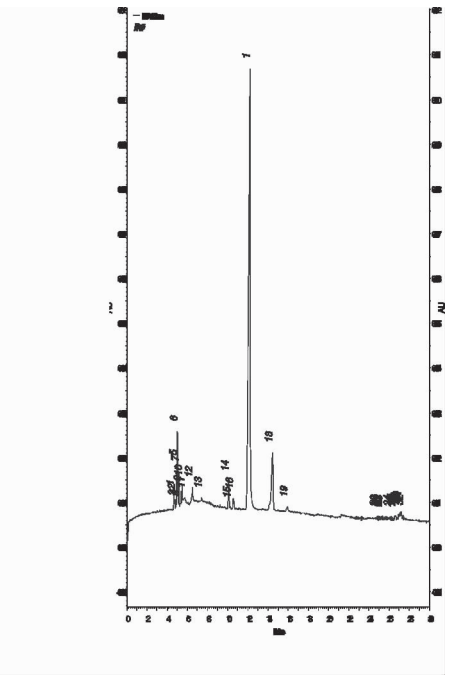


图 9 柑橘凤蝶越冬蛹羽化
初成虫蛋白质电泳图

Fig. 9 Protein electropherograms
of new adult from diapause pupae
of *P. xuthus*

2.2.2 滞育蛹羽化成虫蛋白质特征 电泳结果表明,在 0~20 min 得到 32 个蛋白质吸收峰(图 9,表 1)。峰面积在 1% 以上的有 8 个,分别为第 5、6、7、12、14、16、17 和 18 号峰,迁移时间分别为 4.979、5.042、5.171、6.521、10.088、10.554、12.229 和 14.467 min。峰面积在 10% 以上的 1 个,为第 17 号峰,迁移时间为 12.230 min。

2.2.3 滞育蛹蛋白质特征 柑橘凤蝶滞育蛹在滞育期间蛋白质的种类、含量、数量和变化上与非滞育蛹期和越冬蛹羽化后成虫有明显差异,体现了不同发育时期有着不同的蛋白质特征(表 1,图 1~图 9)。非滞育期间,化蛹初期蛋白质吸收峰数与羽化前差异较大,表现为羽化前夕蛋白质吸收峰增加,主要为迁移时间 5~15 min 的蛋白质吸收峰明显增加,吸收峰在 0~5 min 内略有增加,而在 15~20

min 内没有变化,结果表明羽化前产生了新的蛋白质种类。越冬滞育期间,不同时间蛋白质吸收峰数量、迁移时间分布和峰面积均发生了不同变化。但除 12 月下旬蛋白质吸收峰变化较大,增加较多外,其他时期的蛋白质吸收峰数量变化不大。吸收峰的分布变化主要集中在迁移时间为 5~15 min 之间。滞育蛹羽化成虫蛋白质吸收峰与非滞育蛹化蛹初期相同,比滞育蛹 3 月中旬略有增加。结果表明,柑橘凤蝶滞育期间蛋白质种类,除 12 月下旬有较大增加外,其余时间相对稳定。同时,除 12 月下旬蛋白质吸收峰明显多于非滞育蛹和滞育蛹羽化成虫外,其余时期的吸收峰要少于这 2 个阶段。这说明越冬滞育期间,除 12 月下旬外,其余阶段蛋白质的合成不活跃,12 月下旬可能产生了某些有特殊功能的蛋白质,这些蛋白可能与抗寒性有关,受低温诱导。

表 1 柑橘凤蝶不同阶段蛋白质吸收峰在不同迁移时间段的分布

Table 1 Discriptiong of protein electropherograms absorb apex of <i>P. xuthus</i> in different stages in the scope of different migration time						
迁移时间		0~5 min	5~10 min	10~15 min	15~20min	总数
非滞育期	化蛹初	7	11	9	5	32
	羽化前	10	23	2	5	40
滞育越冬期	10 月下旬	0	12	5	1	18
	11 月下旬	0	18	2	2	22
	12 月下旬	1	19	14	11	45
	1 月下旬	7	12	4	0	23
	2 月下旬	3	12	6	3	24
	3 月中旬	4	10	5	4	23
越冬蛹羽化初		5	8	5	14	32

3 结论与讨论

3.1 特异性蛋白与滞育

研究中发现,很多昆虫在滞育期间出现了一些特殊蛋白质,这些蛋白质只存在于滞育期间或在其他时期含量极少,被称为滞育关系蛋白(DPA),目前已在马铃薯叶甲(*Leptinotarsa decemlineata*)、南方玉米秆草螟(*Diatrea crambidoides*)等多种滞育昆虫体内发现^[27]。DAP 数量与昆虫种类有关,利用普通的 PAGE 电泳在巨座玉米螟体内发现 1 种,在马铃薯叶甲中发现 3 种 DAP,在亚洲玉米螟中发现 2 种,而在家蚕和麻蝇中分别发现 7 种和 15 种 DAP 存在。同时,不同种类昆虫的 DAP 分子量、分子结构及氨基酸组成存在差异。目前对 DAP 的作用机制还不清楚,推断与其可能作为贮藏蛋白和抗冻蛋白的可能性较大。抗冻蛋白质(antifreeze protein, AFP),又称热滞蛋白(therm hysteresis proteins, THPs),在云杉卷叶蛾(*Choristoneura fumiferana*)、黄粉甲(*Tenebrio molitor*)和一种北美甲虫(*Cucujus clavipes*)等很多昆虫中被发现^[24-27]。有研究证明,抗冻蛋白参与了滞育昆虫抗寒性的调节^[28]。

毛细管电泳表明,柑橘凤蝶滞育期间,蛋白质种类在 12 月下旬有较大增加外,其余阶段均要较非滞育期和滞育蛹羽化成虫少。12 月下旬蛋白质种类有较大增加,可能与 12 月下旬气温迅速下降有关,气温下降诱导滞育蛹产生了多种与抗寒有关的蛋白(可能为抗冻蛋白)产生。这些蛋白对提高柑橘凤蝶蛹的抗寒性至关重要,其与海藻糖、糖原和脂肪的能量代谢一道,共同对柑橘凤蝶的抗寒性进行调节。柑橘凤蝶滞育期间蛋白质种类变化表明,可能除抗冻蛋白外,其他滞育关联蛋白种类较少。

3.2 有关毛细管电泳在分析滞育期间蛋白质变化中的一些问题

利用毛细管区带电泳技术,对柑橘凤蝶滞育蛹蛋白质进行了初步研究,并与非滞育蛹及滞育蛹羽化成虫进行了比较。结果显示,滞育期间蛋白质的吸收峰数量、峰面积和迁移时间与非滞育期以及滞育解除后成虫具有明显差异。结果表明,滞育期是一个与非滞育期及滞育解除后成虫完全不同的一特殊阶段,这一期间产生了多种结构和功能不同的特异蛋白质。同时发现,在滞育期间蛋白质处于一个动态的变化过程,无论是吸收峰数量、峰面积还是吸收峰在迁移时间段上的分布都存在明显差异,这些差异反应了不同种类蛋白质在滞育期间的不同作用和功能。不同发育阶段与不同的特异蛋白质相对应。研究结果对进一步了解滞育的发育规律及机制

具有重要作用。研究结果还表明,利用毛细管电泳技术分析滞育期间蛋白质具有极大的优势,能很好地揭示蛋白质种类的变化规律。

但同时也发现毛细管电泳技术的一些不足,主要表现为组分迁移时间和峰面积的重现性较差,因此无法对蛋白质的具体种类变化及含量作更准确分析。这也是当前毛细管电泳中普遍存在的问题,相关文献表明,迁移时间和峰面积有时误差在 5% 以上,其主要受毛细管电渗流、缓冲溶液性质、毛细管柱温、样品进样方式等多种因素影响^[29]。同时,也存在对复杂样品分离不完全的缺点^[30]。因此,对探索如何改进试验方法,增加重现性,将是今后对毛细管电泳技术在昆虫蛋白质分析中的一个重点。一旦这些问题得以解决,毛细电泳技术将在分析昆虫特异蛋白中发挥重要作用。

试验材料由四川峨眉山市胡芳女士提供,在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] DANKS H V. Insect Dormancy, an Ecological Perspective [M]. Ottawa :Biological Survey of Canada, 1987.

[2] 王满囤,李周直. 昆虫滞育的研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2004, 28(1) :71-76.

WANG M Q, LI Z Z. The Research advance of insect diapause [J]. Journal of Nanjing Forestry University, Natural Sciences Edition, 2004, 28(1): 71-76. (in Chinese)

[3] MASAKI S. Summer diapause [J]. Ann. Rev. Entomol, 1980, 25: 1-25.

[4] 苏天运,苏天增. 昆虫滞育化学机制研究概况(上)[J]. 四川动物, 1995, 14(3):113-116.

SU T Y, SU T Z. The overview of insect diapause chemistry mechanism (the first)[J]. Sichuan Journal of Zoology, 1995, 14(3): 113-116. (in Chinese)

[5] 苏天运,苏天增. 昆虫滞育化学机制研究概况(下)[J]. 四川动物, 1995, 14(4):166-169.

SU T Y, SU T Z. The overview of insect diapause chemistry mechanism (the second) [J]. Sichuan Journal of Zoology, 1995, 14(4): 166-169. (in Chinese)

[6] 易传辉,陈晓鸣,史军义,等. 蝴蝶滞育研究进展[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(4):504-510.

YI C H, CHEN X M, SHI J Y, et al. Research advance in butterfly diapause[J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2007, 24(4):504-510. (in Chinese)

[7] 周仲驹. 蛋白质和多肽研究的毛细管电泳技术[J]. 生物产业技术, 2007(1):62-68.

ZHOU Z J. Technology in research protein and polypeptide [J]. Biotechnology & Business, 2007 (1):62-68. (in Chinese)

[8] 阮小林,谢天尧,莫金垣. 毛细管电泳在蛋白质等生物大分子分析中的应用[J]. 现代医学仪器与应用, 2002, 14(4):14-20.

RUAN X L, XIE T Y, MO J H. Application of capillary electrophoresis in macromolecule including protein[J]. Modern medical science apparatus and application, 2002, 14(4):14-20. (in Chinese)

[9] 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,

2006.

CHEN Y. Technology of Capillary Electrophoresis and Application [M]. Beijing: Chemical Industry Press , 2006. (in Chinese)

[10] VRATISLAV K , EDGAR A. A . Recent advances in the analysis of biological particles by capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis. 2008, 29:2578-2586.

[11] 金良, 甘莉. 毛细管电泳在蛋白质和核酸分析研究中的应用[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1):73-76.

JIN L, GAN L. Application of capillary electrophoresis in analysis of protein and nucleic acid [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2003, 22(1): 73-76. (in Chinese)

[12] 姜人春, 颜红岚. 稻褐飞虱实验种群可溶性蛋白质的初步研究[J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(5):419-422.

JIANG R C, YAN H L. A preliminary study on total soluble proteins of nilaparvata lugens laboratory populations [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1998, 20(5): 419-422. (in Chinese)

[13] SUN M, YE G, HU C. Analysis of the soluble proteins in three species of parasitoids and molecular characteristics of yolk protein in pteromalus puparum[J]. Entomologia Sinica, 2001, 8(4): 298-308.

[14] 袁雨, 吕龙石, 金大勇. 长白山区柑橘凤蝶生物学和生态学特性的研究[J]. 农业与技术, 2001, 21(3):19-22.

YUAN Y , LU L S, JIN D Y. The biology and ecology of *Papilio xuthus* in Changbai Mountain Areas[J]. Agriculture & Technology, 2001, 21(3) :19-22. (in Chinese)

[15] HIDAKA T, YOSHIO H. Effect of Non. 24. Hour photoperiod and light interruption of the dark phase on diapause determination in *Papilio xuthus* L. [J]. Proc. Japan Acad. , 1970, 46:541-545.

[16] ENDO K, ITO T, YOSHIHIKO C. Photoperiodic control of pupal diapause in the swallowtail, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera, Papilionidae)-sensitive stage and number of required cycles[J]. Zool. Sci. , 1986, 3: 351-356.

[17] YAMANAKA A, IMAI H, ADACHI M, *et al.* Hormone control of the orange coloration of diapause pupae in the swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) [J]. Zoological Society of Japan, 2004, 21: 1049-1055.

[18] 金大勇, 吕龙石, 韩辉林. 不同温度与光照长度对柑橘凤蝶越冬蛹羽化的影响[J]. 延边大学农学学报, 2000, 22(3) : 217-220.

JIN D Y, Lü L S, HAN H L. Effect of different temperature and lighting length on the eclosion of overwintering chrysalis of *Papilio xuthus* Linnaeus[J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2000, 22(3): 217-220. (in Chinese)

[19] 易传辉, 陈晓鸣, 史军义, 等. 光周期对柑橘凤蝶幼虫生长发育及存活的影响[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1):162-164, 169.

YI C H, CHEN X M, SHI J Y, *et al.* The influence of the photoperiod on larvae of *Papilio xuthus* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2009, 18(1):162-164, 169. (in Chinese)

[20] 易传辉, 陈晓鸣, 史军义, 等. 光照对柑橘凤蝶滞育蛹发育历期的影响[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(2):94-96.

YI C H, CHEN X M, SHI J Y, *et al.* Effects of illumination on the diapause pupae developmental period of *Papilio xuthus* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(2): 94-96. (in Chinese)

[21] 易传辉, 陈晓鸣, 史军义, 等. 温度在柑橘凤蝶滞育解除中的作用[J]. 昆虫知识, 2009, 46(3):453-456.

YI C H, CHEN X M, SHI J Y, *et al.* Role of temperature in the termination of pupal diapause in *Papilio xuthus* [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009, 46(3):453-456. (in Chinese)

[22] 易传辉, 陈晓鸣, 史军义, 等. 柑橘凤蝶非滞育蛹、滞育蛹与滞育蛹羽化成虫蛋白质含量比较[J]. 现代农业科技, 2009 (5):101-102.

[23] 王琳, 易传辉, 和秋菊. 柑橘凤蝶非滞育蛹、滞育蛹和滞育蛹羽化成虫水份含量变化比较[J]. 四川林业科技, 2009, 30 (2):47-49.

WANG L, YI C H, HE Q J. Comparison of water contents among non-diapause pupae, diapause pupae and eclosion-adult from diapause pupae of *Papilio xuthus* L. [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2009, 30(2):47-49. (in Chinese)

[24] 曾庆礼, 陈芳艳, 张冬燕, 等. 昆虫滞育及滞育关联蛋白[J]. 广东蚕业, 2004, 38(2):37-41.

ZHEN Q L, CHEN Y F, ZHANG D Y, *et al.* Insect diapause and diapause associated protein [J]. Guangdong Canye, 2004, 38(2):37-41. (in Chinese)

[25] 赵章武, 黄永平. 昆虫滞育关联蛋白的研究进展[J]. 1996, 33(3):187-191.

ZHAO Z W, HUANG Y P. The research advance of insect diapause associated protein [J]. Entomological Knowledge, 1996, 33(3): 187-191. (in Chinese)

[26] 彭淑红, 姚鹏程, 徐宁迎. 抗冻蛋白的特性和作用机制[J]. 生理科学进展, 2003, 34(3):238-240.

PENG S H, YAO P C, XU N Y. The property and mechanism of antifreeze protein [J]. Progress in Physiological Sciences, 2003, 34(3):238-240. (in Chinese)

[27] 郭怀忠, 毕开顺, 孙毓庆. 影响毛细管电泳分析结果重现性的因素及其控制[J]. 分析仪器, 2005(2) : 42-45.

GUO H Z, BI K S, SUN Y Q. Factors affecting reproducibility of analytical results of capillary electrophoresis and their control[J]. Analytical instrumentatyon, 2005(2):42-45. (in Chinese)

[28] VALERIE A B, TODD S, KENT W, *et al.* Comparative overwintering physiology of alaska and indiana populations of the beetle *Cucujus clavipes* (Fabricius): roles of antifreeze proteins, polyols, dehydration and diapause[J]. Journal of Experimental Biology. 2005, 208: 4467-4477.

[29] 毛文富, 曹梅讯. 亚洲玉米螟滞育关联蛋白的分离和纯化[J]. 昆虫学报, 2001, 44(4):389-394.

MAO W F, CAO M X. Isolation and purification of diapause-associated proteins from hemolymph in *Ostrinia furnacalis* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2001, 44(4):389-394. (in Chinese)

[30] GARCIA, CAMPANA A M, GAMIZ G L, BAEYENS W R, *et al.* Derivatization of bio-molecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. , 2003, 793(1):49-74.