

浙江大学

硕士学位论文

二化螟盘绒茧蜂个体发育及其对寄主二化螟幼虫免疫影响的研究

姓名：李秀花

申请学位级别：硕士

专业：农业昆虫与害虫防治

指导教师：姚洪渭；叶恭银

20110605

摘要

本文对水稻重要害虫—二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫的优势寄生蜂二化螟盘绒茧蜂 *Cotesia chilonis* 个体发育及其对寄主的免疫影响进行了研究,取得以下结果:

一、二化螟盘绒茧蜂的个体发育

二化螟盘绒茧蜂卵属于膜翅目型,卵表面无附属物。二化螟盘绒茧蜂幼虫具有膜翅目细腰亚目幼虫的典型特征。根据幼虫的头宽、体长、腹宽,幼虫可分为3龄。蛹期分为2个阶段:第一阶段呈幼虫状,第二阶段形态裸蛹状,其蛹体表各部分的着色顺序依次为:复眼-单眼-下颚-胸-腹-触角。

二、二化螟盘绒茧蜂主要寄生因子特征初步研究

实验表明二化螟盘绒茧蜂的寄生因子除了毒液以外,还有另外重要的寄生因子:多分DNA病毒和畸形细胞。毒液中大部分蛋白的分子量集中在25-240KDa范围内。PDVs粒子是典型的茧蜂病毒,卵萼内的病毒粒子外被一层单位膜,在膜内可含有一个或多个核衣壳,病毒粒子以细胞裂解的方式被释放到雌蜂萼腔中,成熟的病毒粒子一般呈圆柱状,长度变化很大,中间为高度浓缩的核质。起源于寄生蜂浆膜细胞的畸形细胞呈球形或椭圆形,释放到寄主血淋巴中后,随着寄生日龄的增加,体积迅速增大,畸形细胞的表面有大量微绒毛存在。

三、二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主免疫的影响

与同期未被寄生幼虫相比,寄生幼虫血细胞总量要高于对照;寄生幼虫的血细胞延展率除第2d外均低于对照;寄生幼虫的血细胞的死亡率除第5d外均高于对照;寄生幼虫的血细胞的噬菌能力低于对照;寄生幼虫血细胞的包囊能力降低,并且在1~5d时达到显著性差异。寄生幼虫血细胞的酚氧化酶活性升高,并且在1~2d时达到显著性差异。寄主二化螟幼虫血淋巴黑化作用受到了一定程度的抑制,血淋巴的抑菌能力降低。

四、二化螟盘绒茧蜂毒液和卵萼液对二化螟幼虫主要免疫反应的影响

借助显微注射实验技术手段,对四龄幼虫的二化螟幼虫进行体外注射,研究二化螟盘绒茧蜂毒液和卵萼液对二化螟幼虫的主要免疫反应是否有影响。研究表

明：注射寄生蜂毒液和卵萼液以后二化螟幼虫血腔中的血细胞数量是增加的，而血细胞的延展率是明显降低的，死亡率是明显升高的，包囊能力也呈下降趋势，但是只有前2天存在显著性差异，后来这种差异消失，而酚氧化酶的活性是呈上升趋势的，不过基本不存在显著性差异。通过体外实验我们也可以看出，二化螟盘绒茧蜂毒液和卵萼液对二化螟幼虫离体血细胞的延展能力、死亡率和包囊指数也可以产生影响。

五、二化螟不同地区种群免疫相关指标的比较

对采自8个地区的二化螟种群分别进行免疫相关的指标测定，发现二化螟不同种群在血细胞数量、包囊能力、酚氧化酶活性和可溶性蛋白含量等指标上多存在显著差异。对二化螟不同种群免疫相关指标进行对应分析，将不同地区二化螟分成4个类群：（1）以浙北和苏南为代表的浙江安吉、江苏扬州和高淳种群；（2）以浙西和赣中为代表的浙江富阳和龙游以及江西宜黄种群；（3）以浙中盆地为代表的浙江金华种群；（4）以华中地区为代表的湖北武汉种群。二化螟不同种群在免疫能力上的差异可能与其种群的遗传结构以及生存环境有关。

关键词：二化螟；二化螟盘绒茧蜂；个体发育；寄生；免疫抑制；显微注射；寄生因子

Abstract

Cotesia chilonis (Hymenoptera: Braconidae) is an important natural enemy of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), which is one of the economically most important rice insects in China. The physiological effects of parasitism by this endoparasitoid on its host were studied in this dissertation. The major results are summarized as follows:

1. External morphy and development of immature stages of *Cotesia chilonis*

The egg of *Cotesia chilonis* is hymenopteriform, lacking appendages. The larvae of *Cotesia chilonis* have typic larval morphological characteristics of Apocrita. According to the width of head and abdomen, the length of body, the larvae appear to be hypermetamorphic with three instars. The pupal period has two distinct phases: (a)phase I: appears larvae-like; (b)phase II: exarate pupal appearance with a pigmentation sequence of eyes, ocelli, mandibles, thorax, abdomen, and antennae.

2. Research of the major parasitoid-associated factors of *Cotesia chilonis*

Cotesia chilonis female was found to carry a kind of PDVs and teratocyte as major parasitoid-associated factors beside venom for the first time. Protein content, most of which was ranged from 25 KDa to 240KDa. PDVs were typical braconid polydnviruses with the following characteristics: There was one elementary membrane outside of the virus particles in calyx, and inside of the membrane there was one or some nucleocapsids; They were released to calyx of the female with cell lysis. The mature virus particles are mainly cylindrical, and the length is various. The particle has a genome comprising several DNA segments. The teratocytes originating from the cell of the chorion of *Cotesia chilonis* are spherical or oval. When they were released to hemolymph of the host, there size increased rapidly. there were also a lot of microvilli besides of the teratocytes.

3. Immune change of *Chilo suppressalis* larvae parasitized by *Cotesia chilonis*

The results indicated that compared with the unparasitized larvae, the parasitization by the parasitoid resulted in a significant increase in the total number of hemocytes and the percentage of mortality of hemocytes. The percentage of spread hemocytes was decreased. The phagocytosis of hemocytes was reduced. The

encapsulation capability of hemocytes was also decreased, and showed significant difference in 1-5d. The phenoloxidase activity of hemolymph was increased, and showed significant difference in 1-2d. The melanization of the hemocytes was some a bit inhibited, and the bacteriostatic ability of hemolymph was also decreased.

4. Effects of the venom/calyx fluid from *Cotesia chilonis* on major immune change of *Chilo suppressalis* larvae

When fourth *Chilo suppressalis* instar were microscopic injection with venom/calyx fluid, total hemocyte counts (THCs) indicated that there was some difference in the number of hemocytes per milliliter of hemolymph as compared to values obtained from the PBS-injected control larvae. The percentage of spread hemocytes was significantly decreased, and the percentage of mortality of hemocytes was significantly increased. The encapsulation capability of hemocytes was also decreased, and after the 2 days there was no the significant difference. The phenoloxidase activity of hemolymph was increased, but there was mainly no significant difference. There were also some differences of hemocytes incubated with venom/calyx fluid in vitro on the percentage of spreading rate, the percentage of mortality and the encapsulation capability of hemocytes.

5. Comparison of immune-associated parameters in the larvae from different populations of *Chilo suppressalis*

Some immune-associated parameters in the larvae from 8 populations of *Chilo suppressalis* were detected. There were significant differences in the total hemocyte counts, encapsulation capability of hemocytes and phenoloxidase activity of hemolymph among different populations of *Chilo suppressalis* larvae. The result of correspondence analysis of the immune-associated parameters suggested that the populations of *Chilo suppressalis* larvae could be divided into four groups for their geographic distribution. The difference in the immune ability among *Chilo suppressalis* populations might be related to the population genetic structure and the environment.

Keywords: *Chilo suppressalis*; *Cotesia chilonis*; ontogeny; parasitism; immune inhibition; microinjection; parasitoid-associated factor

本研究承蒙

公益性行业（农业）科研专项

（编号：200803004）

资助

致 谢

怀着憧憬和梦想，经努力拼搏，我终于如愿以偿地步入了百年辉煌的浙江大学学习。回首往事，历历在目。我的收获来自于老师、同学、朋友及家人的无私奉献和帮助，于是心中充满了感激之情。借此机会，今将我最诚挚的谢意写于此，以飨良师、益友及家人。

首先，衷心感谢我的导师姚洪渭副教授和叶恭银教授的悉心指导和辛勤培养。从本论文最开始的选题、试验设计到最后的论文写作，从学习、科研到日常生活，无不倾注着导师的心血和汗水。恩师广博的学识、深厚的学术素养、敏锐的科学洞察力、严谨的治学精神和一丝不苟的工作作风，令我深感钦佩并为之折服，这将对我今后的工作学习产生深远的影响。胡萃先生在治学和做人等方面给予了我很大启迪，留给我一笔宝贵的精神财富。两位师母在平时生活及思想上给予了我很大帮助，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、王晓伟特聘研究员、余虹副教授、刘银泉副教授、鲍艳原副教授、时敏副教授、徐海君副教授、黄佳讲师和马云高级实验师等在实验方面提供诸多便利，您们传授给我的专业知识是我不断成长的源泉，也是完成论文的基础理论。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、马永芳老师和张帆老师在学习和生活上的关心与照顾！向他们表示诚挚的谢意！

导师叶恭银教授带领的研究小组人才聚集、学术氛围浓厚。实验过程中还得到已经毕业的王欢博士、陈洋博士、郭建洋博士、方琦博士、慎小晶博士、朱家颖博士、张倩倩博士、李兆亮硕士、梁丽硕士、李艳敏硕士、高秀云硕士和韩成香硕士的帮助。本实验室王磊、常雪、钱岑、卢增斌、吴顺凡、朱洋铨、郭燕、王伟、王飞、孙方达、程璐、朱宇、姚尧、蒋鹏凌和赵子宵同学在试验过程中提供帮助，感谢与他们朝夕相处的日子里给予了我鼓励、扶持、理解、宽容、慰藉、

友爱、温暖、快乐及美好的回忆!；同时我还要感谢我的室友秦丽、张明燕、王芳、侯艳红、李静静、董丹丹和王红的热情帮助，是她们无私的爱让我的研究生生活更加丰富多彩!

我还要感谢我的父母和亲人，是他们在各方面对我始终如一的理解、关心、支持和帮助，才能使我顺利的完成学业。在这里，也一并向前面没有提及的、多年来教育我的老师和关心、帮助、支持我的同学和朋友们表示衷心的感谢!今后，我将更加努力地学习和工作，不辜负你们对我的殷殷期望!

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!

李秀花

2011年5月与杭州 华家池畔

前言

害虫一直严重威胁全球农作物的安全生产。据估计,全球每年仅害虫危害造成的产量损失就达总产量的 18% (Oerke & Dehne, 2004), 经济损失达 1000 亿美元 (Carlini & Grossi-de-Sà, 2002), 其中仅用于植食性害虫防治每年需花费 75.6 亿美元 (Beckmann & Haack, 2003)。同样,在我国有害生物也是农业增产和农产品质量提高的重要制约因素,据统计全国病虫草鼠害常年年均发生面积达 54 亿亩,虽经防治挽回大量经济损失,但每年粮食仍损失 8.8%、棉花损失 24%,蔬菜和水果损失 20~30%。另外,随着全球人口的增长,害虫的控制将面临更大的挑战。可见,实现有效、经济且安全地控制害虫的危害将是一项长期而艰巨的任务。

害虫控制是保护国家农业生产安全、保障农产品质量安全、减少环境污染、维护人民群众健康、促进农业可持续发展的重要科技支撑,也一直是植物保护学科的首要任务。自化学农药 DDT 问世以来,害虫的防治一直主要依赖化学农药,其中使用的药剂主要是作用于害虫神经递质及其受体或离子通道的有机氯、有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类等 (Casida & Quistad, 1998)。其后果是出现了害虫再猖獗、害虫产生抗药性、农药中毒、农药残留超标、污染严重等问题。若这些问题不能从根本上得以解决,全球和我国农产品安全生产或出口贸易仍将始终面临安全隐患。

寄生蜂,种类繁多,数目庞大,是膜翅目昆虫中的重要类群,估计有 17 万多种,甚至有 32 万种 (Pennacchio & Strand, 2006; Grimmelikhuijzen 等, 2007)。寄生蜂作为一类重要的害虫生物防治作用物,在传统生防中已得到充分肯定,在减少化学农药使用 and 环境污染方面有着重要作用。然而,在生物防治中,至今仍大多使用寄生蜂个体防治害虫,这样其生产规模往往难以扩大,大田使用时还会受环境因子等影响而失去应有的效果。若能真正认识寄生蜂与寄主相互防卫机制,寄生蜂如何干扰抑制寄主免疫和如何调控寄主生长发育,寄主又是如何防卫寄生蜂入侵,寄生蜂在生物防治中将发挥更大的作用。

二化螟 (*Chilo suppressalis* Walker) 属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae, 俗称钻心虫、蛀心虫、旋心虫等,寡食性昆虫,是水稻上的主要害虫之一。二化螟

在中国分布广泛,飞行能力不强,以滞育高龄幼虫当地越冬为主。近些年来,二化螟在我国水稻主产区的危害逐年加重(瞿开良,2007),且具有发蛾早、蛾峰多和多代高发的特点(丁才银,2006)。为控制其危害,目前生产上仍主要依靠化学农药,这不仅给环境造成了严重污染,亦导致了害虫的再猖獗、抗药性增强及次要害虫上升为主要害虫等一系列不良后果(程家安,1996)。我国二化螟寄生性天敌种类丰富,仅寄生蜂即有42种,其中二化螟绒茧蜂(*Cotesia chilonis*)是二化螟幼虫期重要寄生蜂之一,各代幼虫的寄生率为10%~90%,对二化螟田间种群动态起着重要的控制作用(蒋明星等,1999)。

二化螟盘绒茧蜂作为天敌控制二化螟的研究目前较少。因此,二化螟盘绒茧蜂作为防治二化螟的优势种寄生蜂,有必要对其展开系统研究,为实现、发挥其生防作用而提供基础。为此,本文以二化螟—二化螟盘绒茧蜂为模式系统,主要针对二化螟盘绒茧蜂在寄主体内的个体发育过程以及寄生对寄主免疫系统功能的影响展开系统研究,内容主要包括:二化螟盘绒茧蜂个体发育、主要寄生因子及其功能、毒液和卵萼液等对寄主幼虫主要免疫反应的影响等,期望能在明确该寄生蜂是如何逃避寄主二化螟幼虫的免疫反应的基础上,探讨寄生蜂对寄主的免疫抑制和生理调控等机制,为将来天敌应用奠定基础。

第一章文献综述

在寄主—寄生蜂系统中,内寄生蜂作为近年来的研究热点,作为容性寄生蜂,其主要特点是在其寄生寄主后,能够与寄主在一定时间内共存,而不是直接杀死寄主,在主动抑制或被动逃避的前提下将寄主体内的营养流向进行方向性调整(Beckage & Gelman, 2004),从而保证寄生蜂的顺利生长发育。昆虫的免疫反应包括体液免疫和细胞免疫。(Hoffmann等, 1994)。为此,寄生蜂通过各种手段来调节或抑制寄主的免疫反应,以保证自身能够在寄主体内成功发育(Rivers & Denlinger, 1995; Rivers等, 1999; Carton & Nappi, 2001; Rivers等, 2002; Beckage & Gelman, 2004)。在这一过程中,寄生蜂许多寄生因子,例如,毒液, PDV, 卵巢蛋白, VLP以及寄生蜂幼蜂发育过程中产生的畸形细胞和分泌的幼虫蛋白等都发挥重要作用(Beckage & Gelman, 2004)。

1 寄生蜂寄生对寄主免疫调控的影响

1.1 细胞免疫

昆虫免疫系统是抵御病原物和寄生物入侵的防御体系,与高等动物相比,具有独特的免疫机制,虽然昆虫因缺乏T和B淋巴细胞、免疫球蛋白、抗原-抗体反应等而无后天性免疫系统,但其具备良好的先天免疫应答反应机制,且其免疫能力可因外界条件诱导而增强,其中最主要的就是细胞免疫(cellular immunity)(Lavine & Strand, 2002)。昆虫血细胞防御反应包括吞噬、结节和包囊。吞噬是指血细胞内吞入侵的单细胞生物,昆虫血细胞不仅内吞如细菌、酵母和凋亡的机体组织这样的生物目标,也会吞入合成的珠子这样的非生物目标(Yokoo 等, 1995; Hernandez 等, 1999)。结节反应是指昆虫血细胞先形成聚集体然后包被类似细菌的颗粒物形成瘤状物,这些瘤状物最终会被血细胞包围、黑化并从整个循环系统中清除;包囊作用是指血细胞围绕较大的外源异物(通常是寄生蜂的卵和幼虫)形成一个多细胞的包被。

大量研究表明,寄生蜂的寄生因子能改变寄主血细胞总数和各类血细胞的比例,抑制血细胞的延展与粘附能力,或破坏血细胞骨架而降低血细胞的包囊能力等;

以攻克寄主昆虫的细胞免疫系统(Stettler 等, 1998; Beckage & Gelman, 2004; Asgari, 2006)。

寄主被寄生蜂寄生后, 其免疫系统会出现一系列的反应, 如被隆脊瘿蜂 *Leptopilina boulardi* 寄生的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的体内血细胞总数会明显增加 (Carton & Nappi, 1997; Laborosse 等, 2005), 参与包囊反应的主要细胞—薄层细胞的数量与比例明显升高 (Eslin & Doury, 2006; Lanot 等, 2001; Rizki 等, 1992; Russo 等, 2001; Sorrentino 等, 2002)。昆虫血腔中血细胞数量的变化由造血器官中血细胞的增殖和分化情况决定, 这一过程由许多转录和信号传导因子控制 (Meister, 2004)。寄生蜂能调控这些转录和信号传导因子基因的转录水平, 从而扰乱寄主血细胞的正常增殖和分化, 最终导致寄主血细胞数量和比例的改变。例如, 果蝇 *Drosophila* 细胞免疫涉及巨噬细胞 (macrophage) (也称浆血细胞)、叶状血细胞 (lamellocyte) 和晶体细胞 (crystal cell), 其中叶状血细胞的分化需要特殊条件诱导才能发生 (如寄生蜂的寄生), 现已证实匙胸瘿蜂能调控与果蝇叶状血细胞分化相关的一类似脊椎动物 B 细胞早期因子 *collier* (*col*) 基因的表达 (Crozatier 等, 2004)。黑腹果蝇被匙胸瘿蜂和无臂反颚茧蜂寄生后, 其血细胞数量和种类会发生改变, 基因芯片技术研究表明, 许多与 JAK/STAT、Timd 和 Toll 信号传导途径相关的基因会因寄生而发生差异表达 (Wertheim 等, 2005; Schlenke 等, 2007; Carton 等, 2008)。

血细胞的粘附及变形是昆虫免疫过程的关键步骤。昆虫血细胞的包囊是颗粒血细胞和浆血细胞粘着于异物表面的囊鞘结构, 其形成涉及血细胞接触异物后血细胞延展和粘附的性能改变, 该过程受信号分子、粘附分子以及同源接受因子的调控 (Lavine & Strand, 2002)。寄生蜂之所以能抑制寄主血细胞的包囊, 主要是因其活性寄生因子能与调控血细胞延展和粘附性能的因子互作, 破坏血细胞正常的延展和粘附能力, 从而使寄主血细胞包囊能力丧失。Rac 1 和 Rac 2 为 2 种 Ras 类似 GTP 酶 (Ras homologous GTPase, Rho GTPase), 因 GTP 的结合形式不一而不同, 是果蝇血细胞免疫的重要基因, Rac 1 是血细胞粘着于异物的必须因子, Rac 2 与血细胞的延展和凝聚有关 (Williams 等, 2005, 2006)。钙网蛋白是一个 Ca^{2+} 结合蛋白, 除具有钙离子贮藏作用外, 还参与调节多种细胞生理功能, 如作为分子伴侣, 调节细胞钙信号、细胞粘附和基因表达等 (Nakhasi 等, 1998), 因此, 它与昆虫血细胞的粘附、凋亡、成瘤以及包囊等密切相关 (Choi 等, 2002; Asgari 等, 2003)。菜

粉蝶微红盘绒茧蜂毒液中的钙网蛋白,能抑制寄主血细胞的延展,该毒液蛋白很可能是通过与寄主的钙网蛋白竞争血细胞上的结合位点,产生颞抗作用从而使血细胞失去免疫能力(Asgari等,2003;Zhang等,2006)。

寄生蜂除能通过改变寄主血细胞总数和各类型血细胞的比例,以及抑制寄主血细胞的延展和包囊能力等途径来有效抑制寄主细胞免疫反应外,还能诱导血细胞凋亡以破坏寄主的细胞免疫反应。例如,天幕毛虫镶颞姬蜂的PDV能引起舞毒蛾 *Lymantria dispar* 的Ld-652Y细胞系凋亡(Kim等,1996);粘虫盘绒茧蜂 *C. kariyai* 的PDV能引起粘虫 *Pseudaletia separata* 血细胞和造血器官的凋亡(Teramoto & Tanaka, 2004);斑痣悬茧蜂 *Meteorus pulchricornis* 的VLP能使粘虫的颗粒血细胞大量凋亡,并使少量浆血细胞也发生凋亡(Suzuki & Tanaka, 2006);两色侧沟茧蜂 *M. bicoloratus* 的PDV和毒液的混合物能使其寄主斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的血细胞发生凋亡(Luo & Pang, 2006);埃及粘虫侧沟茧蜂的PDV能选择性地使大豆夜蛾的颗粒血细胞发生凋亡(Strand & Pech, 1995),并且该寄生蜂PDV的蛋白酪氨酸磷酸酶H2基因在Sf21细胞系表达后还能使该细胞系凋亡(Suderman等, 2008)。

在不同昆虫中,具有吞噬能力的血细胞类型是不同的。在鳞翅目中,颗粒细胞和浆血细胞是具有吞噬能力的两种血细胞类型,而在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中只有浆血细胞是主要的吞噬细胞(Elrod—Erickson等,2000)。最常观察到的与包囊结节形成有关的血细胞在鳞翅目中是颗粒细胞和浆血细胞,而在双翅目中则是叶状细(lamellocytes)(Vass & Nappi, 2001; Schmidt等, 2001)。

1.2 体液免疫

昆虫体液免疫依赖血淋巴中的先天性免疫和后天性免疫两种因子。先天性免疫因子包括酚氧化酶、溶菌酶、凝集素、抑血细胞聚集素等,后天性免疫因子需要人工或自然诱导,如抗菌肽和抗真菌肽等(Hoffmann, 2005)。

寄生蜂破坏寄主体液免疫反应最常见的是抑制寄主血淋巴的黑化。黑化反应是一个复杂的级联反应,级联反应的末端为酚氧化酶激活酶原,通过限制性水解被激活产生酚氧化酶激活酶,酚氧化酶激活酶水解酚氧化酶原形成酚氧化酶(酚氧化酶原的激活是一个丝氨酸级联反应,需要一系列丝氨酸蛋白酶的参与),酚

氧化酶再将酪氨酸经羟基化和氧化后形成醌(黑色素前体),最终产生黑化反应,且该级联反应受丝氨酸蛋白酶抑制剂或其它蛋白酶抑制剂的调节。黑化首先是苯基丙氨酸在苯基丙氨酸羟化酶(PAH)作用下转化成酪氨酸,随后酪氨酸被氧化成多巴或O-多巴苯醌,与此同时,产生一些黄色至红棕色的色素,在经由一系列酶级联反应最终合成真黑素并沉积下来(Carton等, 2008)。在黑色素合成过程中最关键的步骤就是酪氨酸在酚氧化酶催化下发生氧化反应(Sugumaran 等, 1999)。酚氧化酶一般都是以酶原的形式存在于昆虫的血细胞中,会被一系列丝氨酸蛋白酶所激活(Wertheim等, 2005)。抗菌肽普遍存在于细菌、真菌、昆虫、被囊动物、两栖类动物、甲壳类动物、鸟类、鱼类、哺乳动物以及植物在内的所有生物体中(Dani等, 2003)。

2. 寄生蜂寄生对寄主生长发育的调控

寄生蜂对寄主生长发育的调控有两种形式:一是抑制寄主发育,如近沙草粘虫(裹尸)薄茧小蜂、藏红足侧沟茧蜂、埃及粘虫侧沟茧蜂、粘虫叠绒茧蜂、沙草粘虫(裹尸)薄茧小蜂和棉铃虫康氏裹尸薄茧小蜂等能减缓寄主的生长或抑制寄主化蛹;另一种是使寄主早熟变态,如棉大卷螟甲腹茧蜂*C. inanitus*会促进寄主提前变态(Beckage & Gelman, 2004; Pennacchio & Strand, 2006)。寄生蜂对寄主生长发育的调控实际上是对寄主营养、内分泌、生长因子等调控的结果。寄主昆虫被寄生蜂寄生后,由于寄生蜂幼蜂的发育需要而干扰了寄主昆虫的正常营养吸收过程,除此之外还会引起寄主体内的营养转向,所以大部分寄主昆虫会出现生长受阻,长期保持幼态而不能化蛹的情况。

大量研究表明;寄主一旦被寄生蜂寄生,其体内血淋巴各组分的浓度和脂肪体功能便会发生变化。其中变化最显著的是血淋巴中的芳基蛋白。芳基蛋白是昆虫化蛹过程中的储存蛋白,通常情况下鳞翅目末龄幼虫会在脂肪体内大量合成芳基蛋白,并把这些蛋白释放到血淋巴中,在预蛹阶段脂肪体从血淋巴中吸收并积累芳基蛋白。当寄主被寄生后,有些寄主幼虫脂肪体合成芳基蛋白的时间会明显提前,从而芳基蛋白在血淋巴中一直保持高滴度,如被镶鄂姬蜂*Hyposoter exiguae*寄生的粉纹夜蛾*Trichoplusia ni*幼虫在3龄或4龄时即开始提前表达只在5龄时才表达的储存蛋白基因(Stoltz & Makkay, 2000);而有些寄主幼虫的脂肪体摄

取芳基蛋白的能力被削弱,如被粘虫盘绒茧蜂*Cotesia kariyai* 寄生的东方粘虫*Pseudaletia separata* 幼虫脂肪体组织无法正常积累芳基蛋白颗粒(Tanaka, 1986),被寄生蜂红足侧沟茧蜂*Microplitis croceipes* 寄生的烟芽夜蛾*Heliothis virescens* 幼虫脂肪体中芳基蛋白储存量显著减少,但是这种减少的现象产生于转录后水平(Shelby 等, 1994)。

寄生蜂的寄生不仅会影响寄主血淋巴或其他组织中营养物质的组分或含量,而且调节寄主还能通过体内消化器官的功能达到令其营养代谢转向的目的。被寄生蜂寄生后寄主幼虫的精巢发育受阻是营养转向的一种现象(Tanaka等, 1994; Reed-Larsen & Brown, 1998)。鳞翅目寄主雄性通常在幼虫阶段时精巢就开始发育,其精巢的发育会消耗寄主体内大量营养资源,因此寄生蜂幼蜂为完成发育必须与寄主的性腺竞争营养(Junnikkala, 1985; Tanaka & Tagashira, 1996),如粘虫盘绒茧蜂及菜蛾盘绒茧蜂寄生能够抑制各自寄主的精巢发育(Tanaka & Tagashira, 1996; Bai等, 2009)。

寄主昆虫发育受阻除了由于寄生蜂寄生所引起的寄主体内营养转向之外,也有可能是因为寄生蜂对寄主的生理和发育进行了调节,使得寄主发育与其同步,从而有利于寄生蜂生长发育(Vinson & Iwantsch, 1980)。例如,寄生于棉铃虫*Helicoverpa armigera* 的黑头折脉茧蜂*Cardiochiles nigriceps*,无论寄生于幼龄寄主还是3、4龄寄主,均在5龄寄主钻出化蛹结茧(Tanaka & Vinson, 1991)。这种发育同步现象在内寄生蜂中普遍存在,其控制机理主要涉及到寄主代谢和激素平衡(Lawrence, 1990; Tanaka等, 1994; Fathpour & Dahlman, 1995)。

3.寄生蜂寄生因子的协同作用

寄生的不同时期寄生蜂的寄生因子发挥免疫作用的程度和途径会发生相应的变化。卵表面如类病毒样纤丝(VLF)或类病毒颗粒(VLP)首先发挥被动的免疫抑制功能,保护蜂卵,直至蜂卵孵化((Schmidt等, 2001); 卵巢蛋白和毒液是短期免疫抑制因子(Asgari, 2006); 多分DNA病毒(PDV)是克服寄主血细胞免疫和体液免疫的主要寄生因子(Beckage & Gelman, 2004)。而畸形细胞主要表现在对PDV和毒液作用的增效和补充。

在许多寄生蜂—寄主的系统中,单独的毒液无法对寄主起作用,而只是对寄

液或PDV起增效作用(Zhang等, 2004)。红足侧沟茧蜂*Microplitis croceipes*的毒液单独不能影响其寄主美洲棉铃虫的发育, 而单独的毒液能减弱寄主的生长发育, 但是毒液能增强毒液的作用, 能使其更早的对寄主的生长发育起作用(Gupta & Ferkovich, 1998)。Yu等(2007)研究表明研究表明单独的菜蛾盘绒茧蜂毒液在抑制寄主的免疫反应过程中无法起到重要的作用, 尽管该毒液对浆血细胞的延展有暂时的抑制作用, 菜蛾盘绒茧蜂毒液只是对其毒液起增效作用。

毒液在抑性寄生和容性寄生中所起的作用完全不同: 大多数抑性寄生蜂在产卵过程中注入寄主体内的毒液能引起寄主的永久麻痹或停止发育甚至死亡; 而容性寄生蜂在其产卵后仍容许寄主继续发育一段时间, 待自己完成发育才将寄主杀死, 即容性寄生蜂的毒液一般是暂时麻痹、不完全麻痹或不麻痹寄主的。所以寄生蜂毒液按作用性质可分为麻痹性毒液和非麻痹性毒液; 按作用时间长短可分为暂时性毒液和永久性毒液。麻痹性毒液作用范围一般较广, 而非麻痹性毒液往往有一定的特异性。然而, 不管哪种毒液都是寄生蜂与寄主协同进化的结果, 都在调节寄主发育、保证成功寄生中发挥作用(潘健等, 2004)。

多分DNA病毒(polydnavirus, PDV)是在膜翅目姬蜂科*Ichneumonidae* 和茧蜂科*Braconidae*寄生蜂体内发现的一类很独特的病毒, 分为姬蜂病毒属*Ichnovirus*和茧蜂病毒属*Bracovirus*, 同属于多分DNA病毒科Polydnaviridae。PDV的最大特点是其基因组由多个双链、超螺旋(IV)或松弛(BV)的闭环DNA分子组成, 并且具有特殊的生活史。Beckage(1998)研究发现PDV在卵巢上皮细胞内完成其复制和装配, 成熟后被释放到毒区, 与毒区其他成分组成毒液(calyx fluid)。寄生蜂在产卵过程中, 毒液随同卵一起被注射入寄主体内。PDV以原病毒(provirus)的方式垂直传播给后代, 一旦进入寄主体内, 病毒基因就开始表达。病毒基因可能在蜂、寄主, 或在两者中都能表达。由于PDV在寄主体内并不复制, 因此, PDV基因产物对昆虫免疫抑制的研究显得十分重要(Webb等, 1998)。

寄生蜂卵孵化时, 起胚胎营养作用的浆膜(serosal membrane)依次离解而释放到寄主血腔中, 最后游离形成畸形细胞。初释放释放到寄主血淋巴中的畸形细胞, 大小与寄主血细胞相近, 球形, 然后体积迅速增大, 染色体可增加许多倍, 但细胞并不分裂(Vinson, 1970)。一个寄生蜂的胚胎所产生的畸形细胞数目范围在8-800个(Vinson, 1980)。同一寄生蜂, 随蜂种不同, 畸形细胞在整个寄生期间,

细胞数或者保持不变，或者大量减少(秦启联等，1999；王方海等，1999b；白素芬等，2002)。

综上，寄生蜂携带的不同寄生因子在对寄主昆虫的作用方式和途径上相互协调、补充，不同寄生因子之间的功能相似性和协同性为寄生蜂成功寄生提供了保障。

第二章 二化螟盘绒茧蜂的个体发育

1 引言

寄生蜂有调整或调节寄主生理和发育的能力,使得寄主发育与其同步,从而有利于寄生蜂生长发育(Vinson & Iwantsch, 1980)。这种发育同步现象在内寄生蜂中普遍存在,其控制机理主要涉及到寄主代谢和激素平衡(Lawrence, 1986; Tanaka等, 1994; Fathpour & Dahlman, 1995)。例如,寄生于棉铃虫*Helicoverpa armigera*的黑头折脉茧蜂*Cardiochiles nigriceps*,无论寄生于幼龄寄主还是3、4龄寄主,均在5龄寄主钻出化蛹结茧(Tanaka & Vinson, 1991)。

这种发育同步现象视不同的寄主-寄生蜂系统而不同,在长期的进化过程中,有些寄生蜂能够适应寄主的变态过程,从而能够在寄主不同的生理状态下生存,例如卵-幼虫寄生蜂;而有的寄生蜂仅能在寄主的一种生理状态下生存,如幼虫期寄生蜂。寄生蜂对寄主生长发育的调控实际上是对寄主营养、内分泌、生长因子等调控的结果。就营养调控而言,现在已证实寄生蜂能影响寄主血淋巴内贮藏蛋白的变化,如索诺拉毁蠋姬蜂PDV能使寄主烟芽夜蛾幼虫芳基贮藏蛋白和核黄素基因的翻译水平受到抑制(Shelby & Webb, 1997)。寄生蜂对寄主内分泌的调控表现为使保幼激素、保幼激素酯酶、蜕皮激素在寄主体内的含量失调。Dong等(1996)研究发现,藏红足侧沟茧蜂能使烟芽夜蛾幼虫的保幼激素酯酶转录水平降低从而使其含量下降。二化螟盘绒茧蜂寄生寄主后,其生长发育受到显著影响,寄主幼虫能够存活,但不能完成化蛹直到死去。

本章主要观测二化螟盘绒茧蜂寄生二化螟后的生长与发育动态,以期了解该寄生蜂在寄主体内的个体发育过程,为了解寄主—寄生蜂两者间的互作关系提供信息。

2 材料与方法

2.1 材料

二化螟: 自富阳中国水稻所实验农场采集越冬代二化螟幼虫, 室内群体饲养, 在人工气候室($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L: 8D)内化蛹, 羽化后饲以20% 蜜糖水, 在水稻苗上产卵, 收集卵块, 孵化后以稻种苗饲养(尚稚珍等, 1979), 取四龄二化螟幼虫用于实验。

二化螟盘绒茧蜂: 从富阳中国水稻所实验农场水稻田中采集, 在人工气候室($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L: 8D)内以二化螟幼虫繁殖。寄生蜂羽化后, 饲以20% 蜜糖水。接蜂时, 先把四龄二化螟放入1.8 cm × 8.2 cm的指形管内, 每管1头, 然后接入羽化1d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二化螟幼虫。在人工气候室($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L: 8D)饲养以用来试验。

2.2 卵观察

在PBS 中解剖雌蜂的生殖系统, 分别在Leica MZ 16A 体视显微镜与Leica MPS 30 倒置透射显微镜下观察内部生殖腺并拍照。

2.3 胚胎发育

自二化螟被二化螟盘绒茧蜂寄生后24 h 内, 每隔2 h 解剖出寄主幼虫体内的蜂卵或幼蜂进行观察拍照; 72 h 内, 每隔4 h 解剖一次; 72h 后, 每隔12 h 解剖一次, 直至蜂羽化。

3 结果

3.1 卵的发育

二化螟盘绒茧蜂卵巢属于多滋式卵巢, 滋养细胞 (Nurse cell, NC) 在卵的发育过程中对其提供营养 (图2.1 A)。卵细胞成熟后, 进入卵巢萼区, 在萼区内进行进一步的发育及表面修饰, 主要是与该区域中含有PDVs 的萼液相混合, 然后依次通过输卵管进行产卵。在通过输卵管的过程中, 又有毒液分泌物参与到混

合液中，自此完成产卵前准备。

二化螟盘绒茧蜂的卵属于膜翅目型(hymenopteriform)，一头稍微有些尖(图2.1)。卵呈淡白色，长度大约为0.22 mm，宽度大约为0.07mm。未成熟卵质地均匀(图2.1 B)，卵膜表面光滑，成熟卵在卵孔方呈扇形膨大，膜内部充满物质(图2.1 C)。

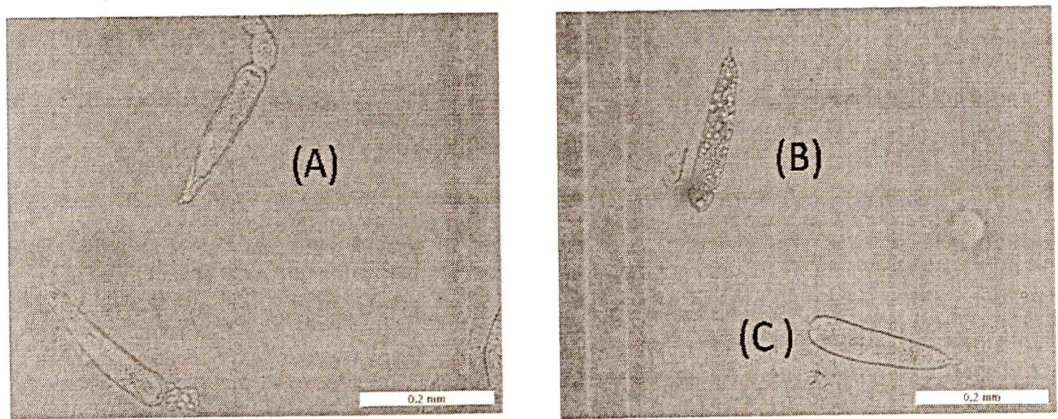


图 2.1 二化螟盘绒茧蜂卵巢内的蜂卵

A、未成熟卵与一个退化的滋养细胞相连；B、未成熟卵；C、成熟蜂卵；

Figure 2.1 Egg dissected from female *Cotesia chilonis* adult.

A Immature egg (E) anterior with a nurse cell (Nc) enclosed with ovariole sheath (Os); B Immature egg; C Mature egg dissected from the calyx region in the ovary.

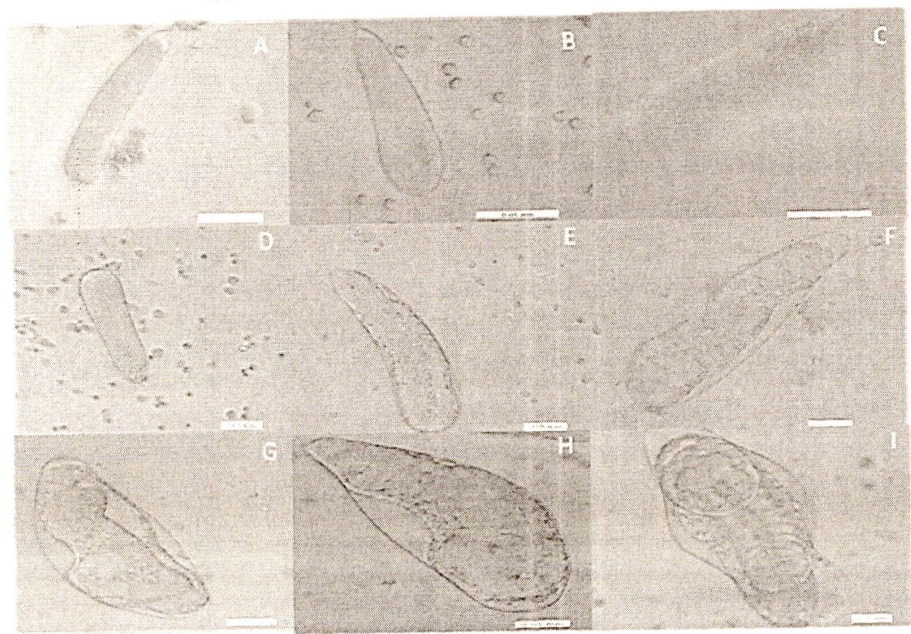


图 2.2 寄生后不同时间内从寄主二化螟幼虫体内取出的二化螟盘绒茧蜂的蜂卵

Figure 2.2 *Cotesia chilonis* eggs (A) and/or embryos (B-I) dissected from parasitized *Chilo suppressalis* at different time points.

3.2 胚胎发育

蜂卵进入寄主体内后，卵的两端膨大，并出现空隙（2.2A）；随后卵出现分裂现象，卵膜内物质从表面开始分裂，在胚胎表面形成滋养羊膜细胞层，并且在卵的远卵孔端分裂较剧烈（2.2B-D），后来胚胎进入原肠胚时期（2.2E-G），此后，开始分化出现体节（2.2H-I）。从蜂卵进入寄主体内，到完成胚胎发育要经过 72h，胚胎呈无色透明状，头壳较大，明显宽于胸腹部。

3.3 幼虫

二化螟盘绒茧蜂的幼虫由头，胸，腹三部分组成，共由 12 个体节构成，体段特征不明显。在早期幼虫的头部是宽大的；在稍后的发育中，幼虫呈圆柱形，躯体不分节，具有膜翅目细腰亚目昆虫幼虫的典型特征。

根据幼虫的头宽，体长和腹宽等特征的变化，我们将二化螟盘绒茧蜂分为 3 个龄期。其中，前 2 个龄期的幼虫在寄主的体内度过，3 龄幼虫从寄主体内啮出并结茧化蛹。

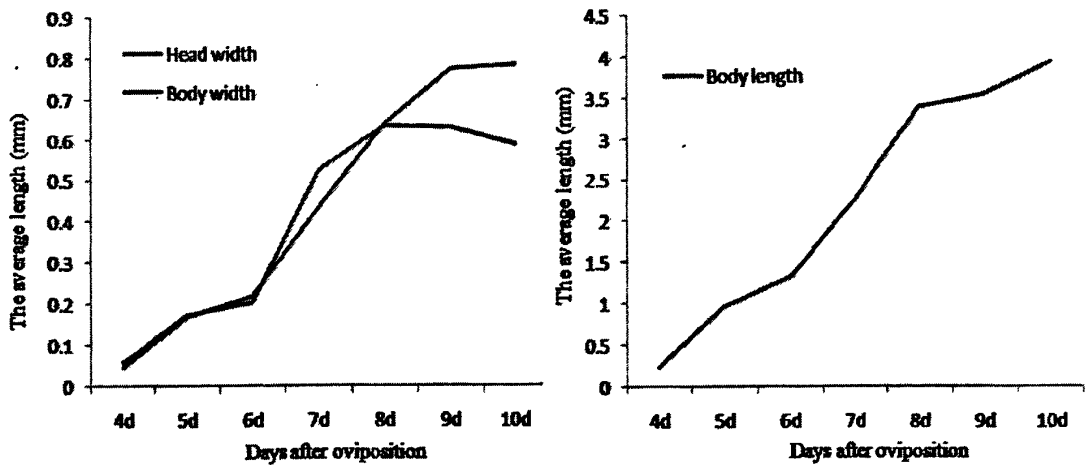


图 2.3 二化螟盘绒茧蜂寄生二化螟幼虫后不同时间幼蜂形态指标

Figure 2.3 Larval morphological index of *Cotesia chilonis* in the larvae of *Chilo suppressalis* at different times after parasitized

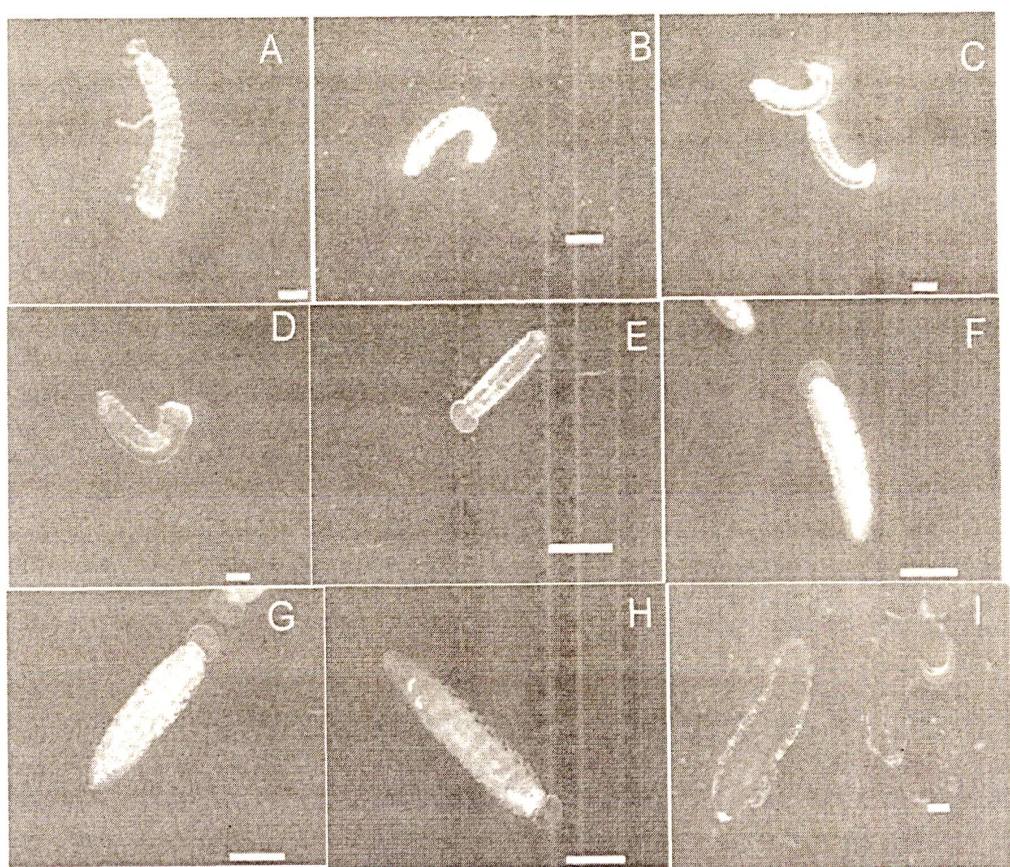


图 2.4 二化螟盘绒茧蜂不同时期的幼蜂

Figure 2.4 The larvae of *Cotesia chilonis* dissected from parasitized *Chilo suppressalis* at different time points

3.3.1 一龄幼虫

二化螟盘绒茧蜂初期的幼虫为具尾型幼虫。初孵幼虫体乳白色，体末具有尾状物，无色透明(图 2.4A)。后逐渐发育为体细长、无色透明，分节，其中头部呈方形，较大(图 2.4B-C)。初孵二化螟幼虫体长(不包括尾状物长)约 0.42-0.505mm，头宽约 0.110-0.115，腹宽(身体最宽处)约 0.90-0.095 mm，经过一天的发育后，体长(不包括尾状物长)约 1.352-2.694mm，头宽约 0.159-0.514mm，腹宽(身体最宽处)约 0.318-0.594 mm。

在 25℃时二化螟盘绒茧蜂一龄幼虫的发育历期约为 2-2.5d。

3.3.2 二龄幼虫

身体无色透明，消化道清晰可见，躯体分节明显，有 12 节(图 2.4E)。2

龄幼虫体长（不包括尾状物长）约 2.694-3.402mm，头宽约 0.514-0.659 mm，腹宽（身体最宽处）约 0.594-0.764 mm. 随着日龄增长，2 龄幼虫在半透明表皮下的内容物逐渐从无色变为黄色。（图 2.4E-F）。

在 25℃ 时二化螟盘绒茧蜂二龄幼虫的发育历期约为 2-2.5d。

3.3.3 三龄幼虫

二化螟盘绒茧蜂 3 龄幼虫体乳白色，呈纺锤状，其中消化道淡黄色，清晰可见(图 2.4G-I)。三龄幼虫幼虫体长（不包括尾状物长）约 3.046-3.089mm，头宽约 0.462-0.627 mm，腹宽（身体最宽处）约 0.728-0.768 mm。

在 25℃ 时二化螟盘绒茧蜂三龄幼虫的发育历期约为 1-1.5d。

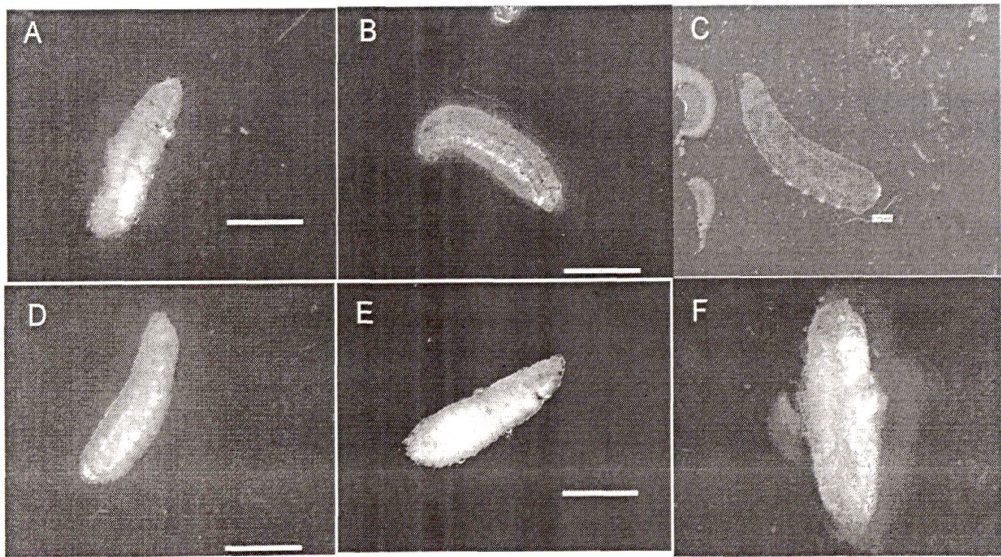


图 2.5 二化螟盘绒茧蜂蛹期的第一阶段

Figure 2.5 *Cotesia chilonis* prepupae (of the pupal phase I) and some of pupae(of the pupal phase II) . Prepupa in the freshly formed cocoon(F).

3.4 蛹

二化螟盘绒茧蜂蜂茧有两层结构，内层为浅黄色，结构致密呈膜质，而外层则为稀疏的银白色茧丝(图 2.5 F)。二化螟盘绒茧蜂蛹期有明显的两种存在状态，初期主要呈幼虫状(图 2.5 A-E)，后期呈裸蛹状。

二化螟盘绒茧蜂预蛹期的幼虫，蛹体浅黄色至黄色，1 对红色复眼清晰可见。第 II 阶段为裸蛹形态，蛹体乳白色，头、胸、腹分节明显，可以清楚的看到 2

个复眼，颜色由淡褐色逐渐加深，3个单眼，触角分节明显，口器初步形成。孵化1d后的幼蜂头部和胸部变黑，而腹部和触角仍为透明。孵化后2天的幼蜂全身变为黑色，至此蜂蛹发育完成，开始羽化。

在25℃时二化螟盘绒茧蜂蛹的发育历期约为3天左右。

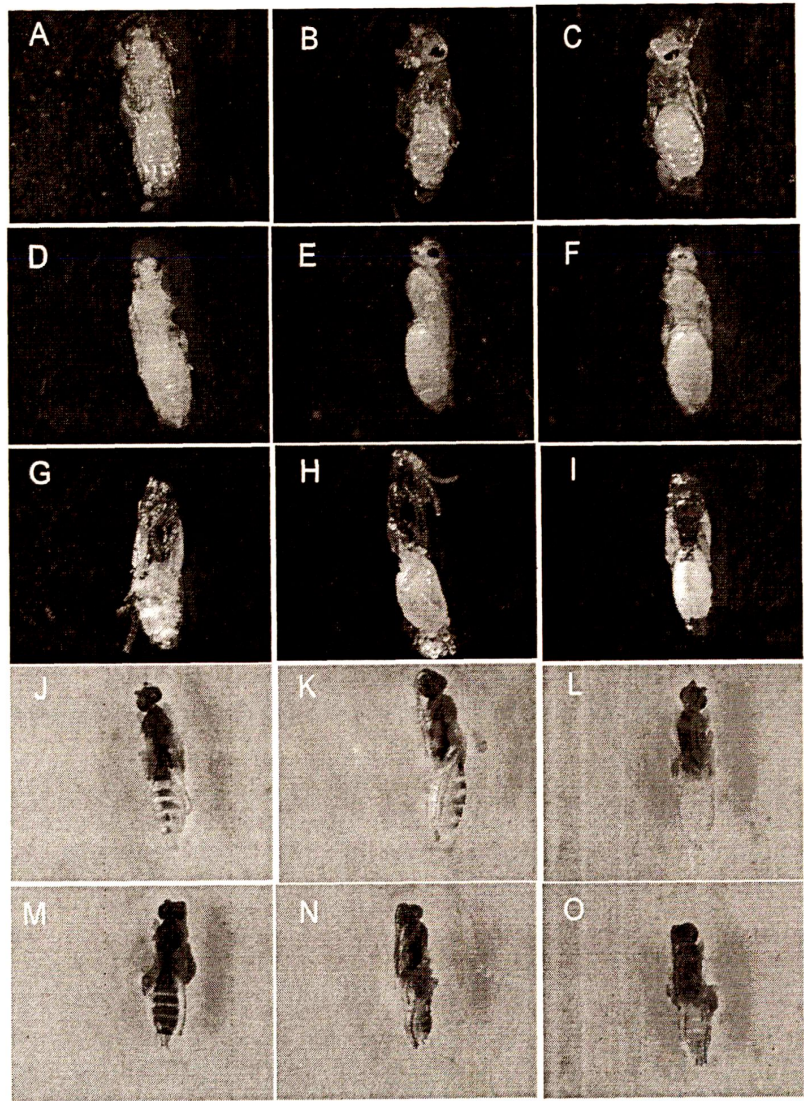


图 2.6 二化螟盘绒茧蜂蛹期的第二阶段

Figure 2.6 *Cotesia chilonis* pupae (of the pupal phase II) in dorsal/lateral/ventral view .

Magnification, 20X.

4 讨论

寄生蜂在维持自然界中农林害虫数量的稳定上起着极其重要的作用。内寄生蜂通常将卵产在寄主体内，并在寄主体内发育。寄生蜂在寄主体内发育时不仅要

面对寄主的免疫系统的攻击,还要调节寄主的生长发育,使得寄生蜂可以在充分利用寄主幼虫体内的养分来生长的同时又能保证自己在寄主体内正常发育。二化螟盘绒茧蜂是一种幼虫期寄生蜂,二化螟幼虫分5-6个龄期,二化螟盘绒茧蜂可以寄生所有龄期的二化螟幼虫,但由于高龄幼虫反抗能力强,其被寄生率很低;而低龄幼虫被寄生后死亡率又较高,而4龄期的幼虫的寄生率高且被寄生后成活率也高,因此选择二化螟4龄幼虫用于二化螟盘绒茧蜂室内种群的繁育及相关试验。

二化螟盘绒茧蜂寄生寄主后,二化螟生长立即加速,在寄生前期,二化螟体重显著增加,但发育受阻,发育历期延长。而对于寄生蜂而言,刚寄生后的寄生蜂由于有较为充分的养分支持,但后期随着个体的生长发育,对生活空间和养料的需求增大,个体间竞争加剧。

寄生蜂的卵可以按卵壳功能的不同分为疏水性和亲水性两种(Flanders, 1942)。疏水性卵内含有大量的卵黄,足以满足胚胎发育所需的营养,而亲水性卵卵黄含量不高,必须通过卵壳从寄主中吸取营养才能完成胚胎的发育。寄生性膜翅目昆虫中,尤其是内寄生蜂,其种类的卵多属于亲水性卵(Quicke, 1997)。研究发现诸多此类蜂卵均具高度弹性,从而保证蜂卵可以通过狭长的产卵管而不致被挤压受损,而蜂卵一旦被产入寄主体内,通过几小时至几天的发育就能迅速膨胀(Le, 1995; Quicke, 1997; Schlinger & Hall, 1960)。二化螟盘绒茧蜂的卵从寄生到即将孵化的发育过程中卵的长度和宽度都发生膨胀。在整个胚胎发育过程中,寄生卵通过卵壳从寄主血淋巴中不断吸取营养物质,卵壳中的胚胎迅速发展使得寄生卵的体积不断膨胀、增大。而在其他寄生蜂的胚胎发育过程中亦出现类似的膨胀现象,如茧蜂*Praon palitans* (Schlenger & Hall, 1960)和*Cotesia vestalis* (Yu等, 2007)。King 等人(1969)研究发现亲水性蜂卵的卵膜较疏水性蜂卵薄而复杂; Le Ralec也认为亲水性蜂卵表面沟壑纵横,如*Lepoilina*; 而疏水性蜂卵表面则是很光滑,且钢化程度较高,如跳小蜂*Epidinocarsis lopezi*。据此,二化螟盘绒茧蜂的卵属于亲水性卵。此外,二化螟盘绒茧蜂卵表面并不存在诸如刚毛(Arthur, 1961)、突起(Davies & Vinson, 1986)、卵柄等(Hagen, 1964)之类的附属物。

与中红侧沟茧蜂(秦启联)一样,二化螟盘绒茧蜂也生活在寄主幼虫的血淋巴中,两者都是单胚发育,且它的胚胎期非常短暂,一般少于3天,而腰带长体

茧蜂的胚胎期约为8~9天(胡建),而腰带长体茧蜂是典型的多胚发育。由此我们可以看出,单胚发育寄生蜂的胚胎期与多胚发育种类相比明显缩短是与单胚发育的特性相适应的。

实验表明,二化螟盘绒茧蜂的幼蜂分为3个龄期,其中,前2个龄期的幼虫在寄主的体内度过,3龄幼虫从寄主体内啮出并结茧化蛹。前人研究表明,茧蜂的幼虫分为3个龄期是茧蜂的一个显著特点(O'Donnell, 1987; Shaw, 1991; Carignan, 1995),在实验中我们发现,二化螟盘绒茧蜂从卵到啮出体外结茧大概需要10-12天,这可能与我们的实验的温度及营养条件有关。

许多种类的寄生蜂,都能结茧化蛹。二化螟盘绒茧蜂蛹初期呈幼虫状,单眼和复眼都是有颜色的,蛹发育到后期阶段,呈裸蛹状,伴随着蜂蛹的发育,下颚,胸腔,腹部,触角的颜色依次逐渐加深。这与棉大卷叶螟甲腹茧蜂(Albert, 1994),半壁弯尾姬蜂(黄芳, 2008)个体发育过程中的体表着色顺序是一致的。

第三章 二化螟盘绒茧蜂主要寄生因子特征初步研究

、 1 引言

多分DNA病毒(polydisperse DNA virus, polydnavirus, PDV), 是在寄生蜂体内发现的一类很独特的病毒。PDVs 是一组无包涵体的病毒, 含有双链环状DNA基因组, 这些DNA 基因组常含有20~25 种不同型的DNA 片段(Theilmann & Summers, 1988)。根据形态学特征和寄主范围的明显差异, 这些病毒可分为两大类, 即茧蜂病毒属和姬蜂病毒属。茧蜂病毒仅存在茧蜂科的某些寄生蜂中, 其基因组被封闭在长度不等的圆柱形核衣壳里, 核衣壳由一层囊膜包裹(Hamm, 1990); 姬蜂病毒则仅存在姬蜂科的某些寄生蜂中, 其基因组被封闭在大小均一的纺锤状核衣壳里, 核衣壳由两层囊膜包裹(Krell 等, 1982)。PDV 在雌蜂卵巢萼上皮细胞内进行复制, 当病毒粒子在萼细胞内发育成熟后, 就被释放到萼腔里与其它物质一起组成萼液(calyx—fluid), 所以萼液中包含有许多病毒颗粒(Stoltz & Vinson, 1979)。病毒粒子一旦随寄生蜂产卵进入寄生蜂的寄主体内, 即可在不同组织细胞中转录, 通常寄生蜂产卵后2h 即可检测到病毒粒子的产物(Stoltz, 1990)。内寄生蜂的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。畸形细胞是来源于寄生蜂发育胚胎外胚膜——浆膜, 当蜂卵孵化时释放到寄主血腔中的一种特殊类群的细胞。它具有很强的蛋白合成和分泌能力; 可作为幼蜂直接的营养来源; 在调节寄主生理代谢保证幼蜂发育中发挥重要作用。

本文将初步探明一下二化螟盘绒茧蜂的主要寄生因子, 并观察一下其主要特点。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

见第二章2.1.

2.2 寄生蜂 PDV 的显微观察

显微镜下解剖一定量的二化螟盘绒茧蜂的卵萼区，将样品在 2.5%的戊二醛溶液中 4℃固定过夜，然后按下列步骤处理样品：

- ✧ 倒掉固定液，用 0.1M, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15min;
- ✧ 用 1%的锇酸溶液固定样品 1-2h;
- ✧ 倒掉固定液，用 0.1M, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15min;
- ✧ 用梯度浓度（包括 50%，70%，80%，90%和 95%五种浓度）的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15min，再用 100%的乙醇处理一次，每次 20min；最后过度到纯丙酮处理 20min.
- ✧ 用包埋剂与丙酮的混合液（V/V=1/1）处理样品 1h;
- ✧ 用包埋剂与丙酮的混合液（V/V=3/1）处理样品 3h;
- ✧ 纯包埋剂处理样品过夜;

将经过渗透处理的样品包埋起来，70℃加热过夜，即得到包埋好的样品。样品在 Reichert 超薄切片机中切片，获得 70-90nm 的切片，该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 15min，即可在日本 JEOL 公司的 JEM-1230 型透射电镜中观察。

2.3 毒腺分泌物蛋白 SDS-PAGE 电泳

解剖100 头半闭弯尾姬蜂雌蜂，收集毒腺，高速离心使毒液分泌物释放到 20 μ l PBS 中，-80℃贮藏或直接进行实验。Bradford 方法测蛋白浓度；SDS-PAGE 电泳条件：12%的分离胶，2.5%浓缩胶，电极缓冲液为 Tris-甘氨酸电极缓冲液系统；电泳电压 80 V。

2.4 畸形细胞的观察

解剖不同日龄的寄生后的二化螟，观察寄主血腔中的畸形细胞，并对不同日龄的畸形细胞用倒置相差显微镜（Leica DML MPS 30）拍照。

3 结果

3.1 二化螟盘绒茧蜂 PDV 的显微结构

二化螟盘绒茧蜂的PDV 在雌蜂卵巢上皮细胞内进行复制（图3.1 A），二化螟盘绒茧蜂卵内的病毒粒子外被一层单位膜，在膜内可含有一个或多个核衣壳（图3.1 B），病毒粒子以细胞裂解的方式被释放到雌蜂母腔中（图3.1 C）。成熟的病毒粒子一般呈圆柱状，长度变化很大，中间为高度浓缩的核质（图3.1D）。

在萼区内的卵细胞表面还具有绒毛膜，绒毛膜呈明显的多层结构而膜表面的纤丝为中空的小管，虽然萼区内含大量的PDVs 粒子，在高度放大情况下，可以清晰的观察到病毒粒子并不会附着到绒毛膜表面（图3.1 E-F）。

3.2 毒液器官

二化螟盘绒茧蜂的毒液器官由两条毒腺、一个毒囊和通向产卵器的毒液管组成。两条毒腺呈Y 型连接于球状毒囊的顶端，毒囊呈近圆球状。

毒液中大部分蛋白的分子量为25-240KDa，其中几种分子蛋白的含量相对较高。

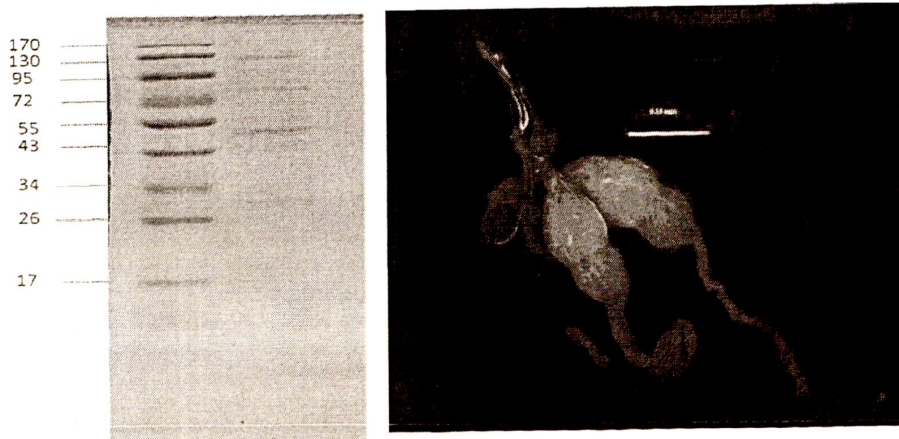


图3.2 二化螟盘绒茧蜂雌性生殖系统和毒腺内容物蛋白质电泳

Figure 3.2 Female reproductive system of *Cotesia chilonis* and SDS-PAGE of venom

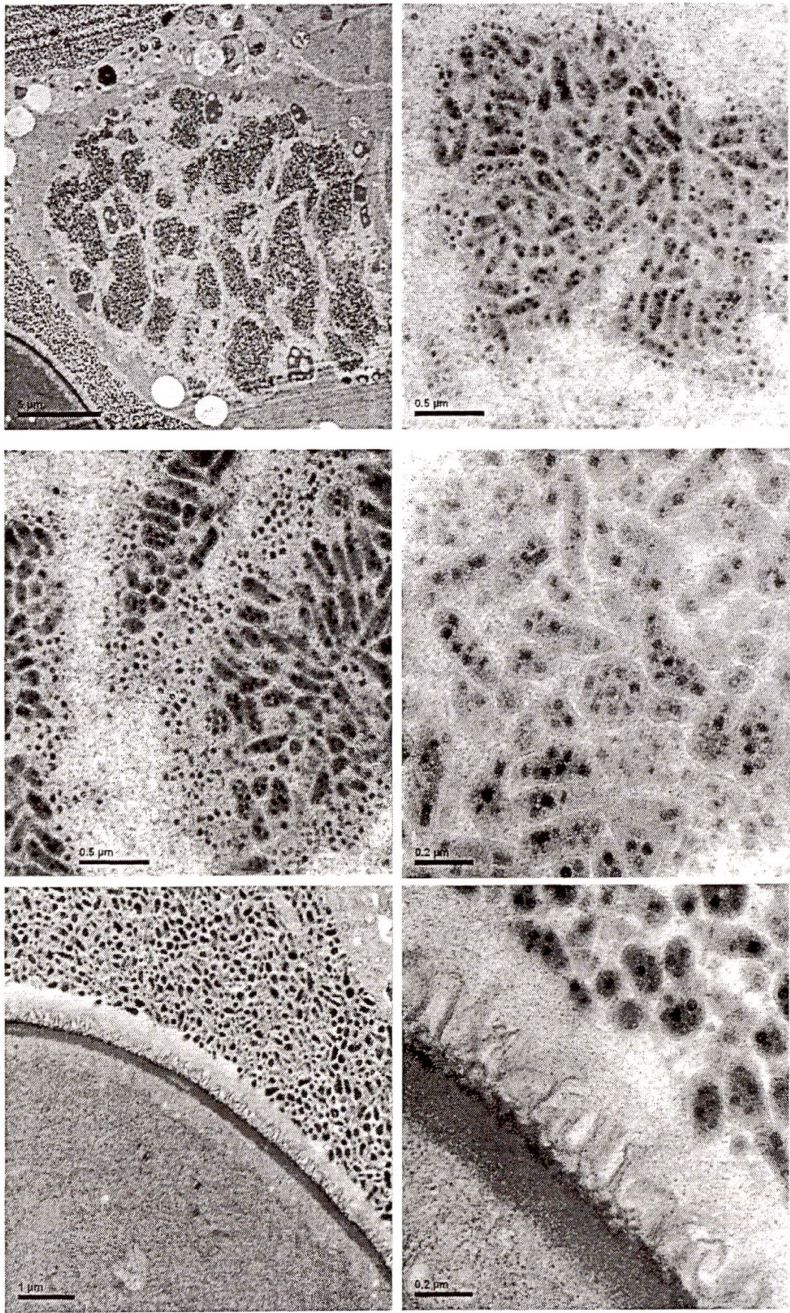


图 3.1 A PDVs 病毒发生基质 (Vs)；B 获得膜的PDVs 粒子；C 裂解状态中的PDVs 粒子；D成熟PDVs 粒子；E 在卵萼区内的蜂卵；H 卵表面的绒毛膜

Figure 3.1 A Patches of virogenic stroma (Vs); B Virus particles with membrane; C Virus particles were migrating through the cytoplasm and into the lumen of the ovary with cell lysis; D mature Virus particles; E An egg in the calyx region; F Egg chorion was thick, multilayered and with trabeculae;

3.3 畸形细胞

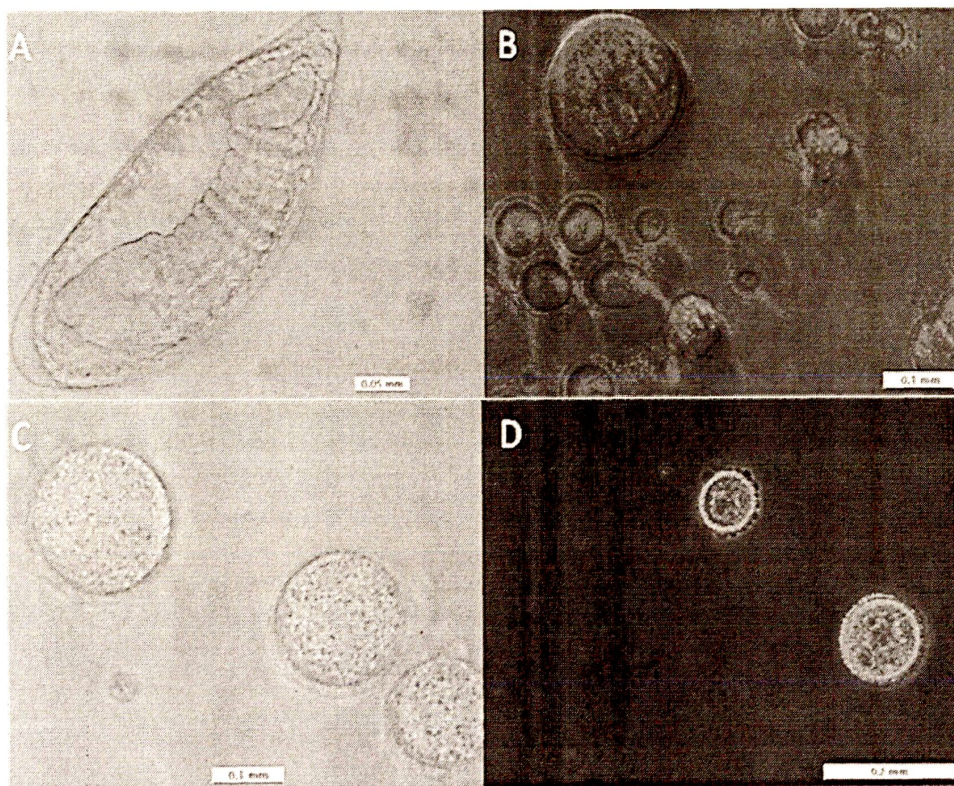


图3.3 不同时期的畸形细胞

A 68h 的卵; B-D 寄生后6-8d 的畸形细胞

Figure 3.3 The teratocyte after parasitism at different time

A 68-hour egg B-D the teratocyte after parasitism from 6-day to 8-day

二化螟盘绒茧蜂卵从初产到幼蜂即将孵化, 体积明显增大。而包裹在胚胎外的浆膜也清晰可见(图3.3A), 后来浆膜分化形成畸形细胞。当幼虫即将孵化时, 随着胚胎的扭动, 可见卵中已有球形的游离细胞在卵壳内滚动, 幼蜂孵化时, 卵壳和浆膜层多从卵的一侧破裂, 随着幼蜂的脱出, 细胞以单个或细胞团的形式释放到寄主血淋巴中, 仍有部分细胞暂时停留在卵壳内, 随后才分散到寄主血腔中。畸形细胞呈球形或椭圆形, 释放到寄主血淋巴中后, 随着寄生日龄的增加, 体积迅速增大, 但畸形细胞不进行有丝分裂, 畸形细胞的发育速率并不完全一致, 同一日龄的细胞大小悬殊很大(图3.3B), 畸形细胞的表面有大量微绒毛存在(图3.3C)。

4 讨论

本实验明确了二化螟盘绒茧蜂卵巢区确实存在PDVs病毒粒子,在卵巢萼区,发现PDVs粒子并不附着于蜂卵表面。而这一现象在其他寄生蜂中也有相关报道,如弯尾姬蜂*Diadegma terebrans* (Krell, 1987)、黑唇姬蜂*Campoletis sonorensis* (Norton等, 1975)、缘腹绒茧蜂*Cotesia marginiventris* (Hamm等, 1990)、集聚绒茧蜂*Cotesia congregata* (Buron & Beckage, 1992)和棉大卷叶螟甲腹茧蜂*Chelonus inanitus* (Wyder & Lanzrein, 2003)。然而,在有的寄生蜂卵表面则发现有PDVs参与形成的一层特殊结构(Cusson等, 1998)。虽然在二化螟盘绒茧蜂的蜂卵表面没有附着PDVs粒子,但是在寄生的同时,PDVs粒子仍然与蜂卵一起进入寄主的体内,至于其作用及意义则需要进一步的研究。

寄生蜂毒器官是分泌和储存毒液的场所。目前关于寄生蜂毒液的研究相对比较贫乏,近年来人们往往更关注于毒液的活性成分的研究,在寄生蜂毒器官中发现的毒液组分主要为蛋白质和酶类,它们是寄生蜂成功寄生的关键生理活性物质(Moreau & Guillot, 2005),因此近年来毒液蛋白的研究发展相对较快。迄今研究过的寄生蜂毒液中均存在大于100 kDa的高分子量蛋白,有些寄生蜂毒液中只存在高分子量蛋白,如近曲斑甲腹茧蜂、麦蛾茧蜂和菜粉蝶绒茧*A. glomeratus*等的毒液蛋白分子量都大于10 kDa (Leluk等, 1989; Quistad等, 1994)。而在有的寄生蜂中也存在多肽,如东方旋小蜂*Eupelmus orientalis*、寮黑瘤姬蜂、无臂反顎茧蜂、菜粉蝶微红盘绒茧蜂、蝶蛹金小蜂、丽蝇蛹集金小蜂和颈双缘姬蜂等(郇卫弟; 2005; 张忠, 2005; Doury等, 1997; Parkinson等, 2002; Asgari等, 2003; Dani等, 2003; Moreau等, 2004; Zhang等, 2004)。二化螟盘绒茧蜂毒液亦以高分子量蛋白成份为主,这些蛋白成分在寄生蜂突破寄主免疫抑制中生理功能需和进一步研究。

畸形细胞是一类地位十分特殊的细胞,它起源于寄生蜂的浆膜细胞,属于寄生蜂的物质,但又生长在寄主的血腔中,在寄生蜂的寄生过程中扮演着非常重要的作用。目前对于寄生蜂的畸形细胞的结构的研究已经有了比较清楚的了解,但是对于其功能的研究则没有十分准确的说法。在黑头折脉茧蜂*Cardiochiles nigriceps*中,由产卵后14h后卵的前后极数层浆膜细胞形成畸形细胞,而中间的单层浆膜细胞形成无核合体细胞,继续贴附在初孵1龄幼虫体上并退化,然而在

红足侧沟茧蜂*Microplitis froceipes*、中红侧沟茧蜂*Microplitis mediator*的整个浆膜仅有一层细胞组成,它在蜂卵孵化的时候全部发育成畸形细胞(秦启联等, 2000; Zhang等, 1989)。在本实验中,我们发现二化螟盘绒茧蜂的整个浆膜也是由单层细胞组成的。畸形细胞表面大量的微绒毛的存在,可能与其在寄生蜂中的营养作用有关,然而关于其具体作用则需要进一步的研究。随着寄生蜂的发育,数量保持不变(Vinson & Lewis, 1973; Gerling & Orion, 1973),但多数种类数量下降(Kandono等, 1995; Strand & Wong, 1991; Barratt & Sountherland, 2001; Hotta等, 2001)。二化螟盘绒茧蜂卵的浆膜由单层细胞组成。畸形细胞表面存在大量的微绒毛,可能与为寄生蜂幼虫生长和发育提供营养作用有关。有关二化螟盘绒茧蜂畸形细胞的数量变化及其功能作用至今尚未明了,需进一步研究。

第四章 二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主细胞免疫的影响

1. 引言

昆虫免疫系统是抵御病原物和寄生物入侵的防御体系,与高等动物相比,具有独特的免疫机制,虽然昆虫因缺乏 T 和 B 淋巴细胞、免疫球蛋白、抗原-抗体反应等而无后天性免疫系统,但其具备良好的先天免疫应答反应机制,且其免疫能力可因外界条件诱导而增强,其中最主要的就是细胞免疫 (cellular immunity) (Lavine & Strand, 2002)。大量研究表明,寄生蜂的寄生因子能改变寄主血细胞总数和各类血细胞的比例,抑制血细胞的延展与粘附能力,或破坏血细胞骨架而降低血细胞的包裹能力等,以攻克寄主昆虫的细胞免疫系统 (Stettler 等, 1998; Beckage & Gelman, 2004; Asgari, 2006)。

目前大多数昆虫血细胞分为以下几类:原血细胞 (Prohemocytes)、颗粒血细胞 (Granular hemocytes)、浆血细胞 (Plasmatocytes)、类绦色细胞 (Oenocytoids) 和珠血细胞 (Spherule cells) 等 (Lavine & strand, 2002)。但是并不是所有昆虫中都含有这几种血细胞,并且有的昆虫还有其它类型的血细胞。昆虫种类繁多,不同类型的血细胞在形态、数量上差异较大。原血细胞是血淋巴中最小的血细胞,呈圆、卵圆或椭圆形,具有类似干细胞功能,可以分化成多种血细胞 (Lavine & Strand, 2002)。在血细胞实施免疫反应的过程中,不同类型的血细胞在昆虫免疫过程中所起的作用是不同的。颗粒血细胞大小多变,球形或卵圆形,是鳞翅目昆虫中数量最多的血细胞。浆血细胞形态大小都多变,延展成梭形。颗粒血细胞和浆细胞具有附着延展性,既可以黏附在大的外源物如寄生蜂表面并将其包裹并黑化杀死,也可以吞噬细菌等小的入侵物或将多个细菌聚集在一起形成结节,颗粒血细胞和浆血细胞的粘附能力是实现昆虫细胞免疫的基本条件 (Johansson, 1999)。因此这两类细胞通常是参与免疫反应的主要细胞类型 (Schmidt 等, 2001; Strand & Pech, 1995)。

细胞免疫作为昆虫免疫系统的重要组成部分,具有非常重要的意义,而且在

寄主-寄生蜂系统中寄主的细胞免疫也一直是研究的主要对象。一般在寄主-寄生蜂研究系统中,血细胞的数量、延展性、包囊能力、吞噬能力等式检测细胞免疫水平的主要参数,而在已有的研究中,不同的寄主-寄生蜂系统以上免疫参数都发生不同程度的变化。

到目前为止,二化螟幼虫的血细胞类型及相应功能还不确定,对血细胞进行分类是很有必要的,此外,本章还研究了二化螟盘绒茧蜂对寄主幼虫血细胞的影响,旨在进一步明确二化螟盘绒茧蜂寄生对二化螟幼虫细胞免疫的影响,以揭示该蜂与寄主相互作用的免疫机制。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

见第二章2.1。

2.2 血细胞总数及主要类型血细胞数量的测定

分别于寄生后第0.5、1、2、3、4、5 d 在无菌操作台内取单头二化螟幼虫血淋巴镜检。取血时,在 Parafilm 膜上用灭菌后的眼科剪剪去幼虫的腹足,待血淋巴自然流出吸取5 μ L 的血淋巴,置入 Eppendorf 离心管中,并加入10 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。在相差显微镜下(200 x),以血球计数板测定血细胞总数和各类型血细胞数量。每次测定寄生和同期未寄生4龄二化螟幼虫各5头,并重复3次。考虑到鳞翅目血细胞中以颗粒血细胞和浆血细胞为主,且是细胞免疫反应的关键血细胞,故本文在各类细胞记数时仅考查颗粒血细胞及浆血细胞的数量及其他参数。

2.3 血细胞延展率和死亡率的检测

无菌操作台内采集二化螟幼虫血淋巴,置于含少量苯基硫脲的 Eppendorf 离心管中,加到含有一定体积 TC100 昆虫细胞培养液(含10%胎牛血清)的96孔细胞培养板中。置27℃细胞培养箱中培养一段时间后置 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血细胞数量,计算血细胞的延展率,浆血细胞变为梭形或其它不规则形状计数为延展,颗粒血细胞以细胞伸出伪足计数为延展,两种细胞均以圆形计数为未延展。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。每次检查寄生四龄二化螟幼虫 5 头,同期未寄生四龄二化螟幼虫 5 头。

2.4 寄生蜂寄生后血细胞噬菌能力检测

参照 Tojo (2000) 的方法并加以改进,往置有盖玻片的培养皿中加入一定体积的血细胞以形成单层细胞,培养一段时间后加入含有 3×10^8 个 FITC 标记大肠杆菌(上海英骏生物技术有限公司),在 28℃ 黑暗下孵育一段时间, PBS 冲洗单层细胞后加入一定体积 0.2% 的台盼蓝碎灭未被吞噬的大肠杆菌上的荧光,在显微镜下拍照,计算有吞噬行为的细胞所占的比例。检查寄生后 0.5、1、2、3、4、5 d 的单头 4 龄二化螟幼虫 5 头,同期未寄生 4 龄二化螟幼虫 5 头。

2.5 寄生蜂寄生后血细胞包囊能力检测

取二化螟幼虫一定体积的血淋巴加入到已放有 TC-100 昆虫细胞培养基的 96 孔细胞培养板中,加入一定体积的 PTU 溶液和一定浓度的微珠,并用 Parafilm 膜封好,放在 27℃ 恒温箱内,培养 12h 取出,观察包囊形成过程,并计算包囊率(张忠,2005)。其中,包囊指数(%)= $[\sum(\text{某一包囊级数} \times \text{该包囊级别的 Sephadex A-50 微珠数目}) / (\text{供试 Sephadex A-50 微珠的总数} \times 5)] \times 100$ 。每次检查寄生四龄二化螟幼虫 5 头,同期未寄生四龄二化螟幼虫 5 头。

3. 结果

3.1 寄生后二化螟幼虫血细胞数量与组成的变化

四龄二化螟幼虫的血细胞共有5类, 即原血胞 (prohemocyte)、浆血细胞 (plasmatocyte)、颗粒血细胞 (granulocyte)、珠血细胞 (spherulocyte) 和囊血细胞 (cystocyte)。考虑到鳞翅目血细胞中以颗粒血细胞和浆血细胞为主, 且是细胞免疫反应的关键血细胞, 故本文在各类细胞记数时仅考查颗粒血细胞及浆血细胞的数量及其他参数。

结果如图 4.1 所示。二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后, 其血细胞总数、颗粒血细胞和浆血细胞数量均有不同程度地增多。寄生幼虫的血细胞总量均高于同期未寄生幼虫, 除寄生后第 0.5 d 外均达到显著性差异。就颗粒血细胞, 寄生后第 0.5~2 d 的数量与同期未寄生的相比无差异显著, 但寄生后第 3~5 d 的数量则显著高于同期未寄生的幼虫。与此相比, 寄生后第 0.5~5 d 的浆血细胞数量则均显著高于同期未寄生的幼虫。就颗粒血细胞和浆血细胞占血细胞总数的比率而言, 寄生的颗粒血细胞比率与未寄生的相比无显著, 而寄生的浆血细胞比率除寄生后第 3 d 外与未寄生相比也无显著差异。

3.2 寄生对二化螟幼虫血细胞延展率和死亡率的影响

结果如图 4.2 所示。二化螟幼虫的颗粒血细胞和浆血细胞均具有可延展的特性。血细胞的延展性是衡量细胞免疫反应能力的重要指标之一。二化螟盘绒茧蜂的寄生行为可显著影响二化螟幼虫血细胞的延展性。对于对照幼虫来说, 寄生初期对二化螟幼虫血细胞延展有抑制作用, 但之后延展率有回升的趋势, 其中寄生后第 0.5 d 的延展率显著低于未寄生的, 但此后寄生与未寄生间无显著差异, 表明寄主血细胞对外源蜂卵的免疫反应受到显著影响; 随着时间延长, 二化螟幼虫血细胞的延展率呈回升趋势。就血细胞死亡率而言, 寄生的影响更为明显, 寄生后血细胞的死亡率多高于同期未寄生幼虫, 其中寄生后第 1-4 d 的死亡率显著高于未寄生的 (图 4.3.)。

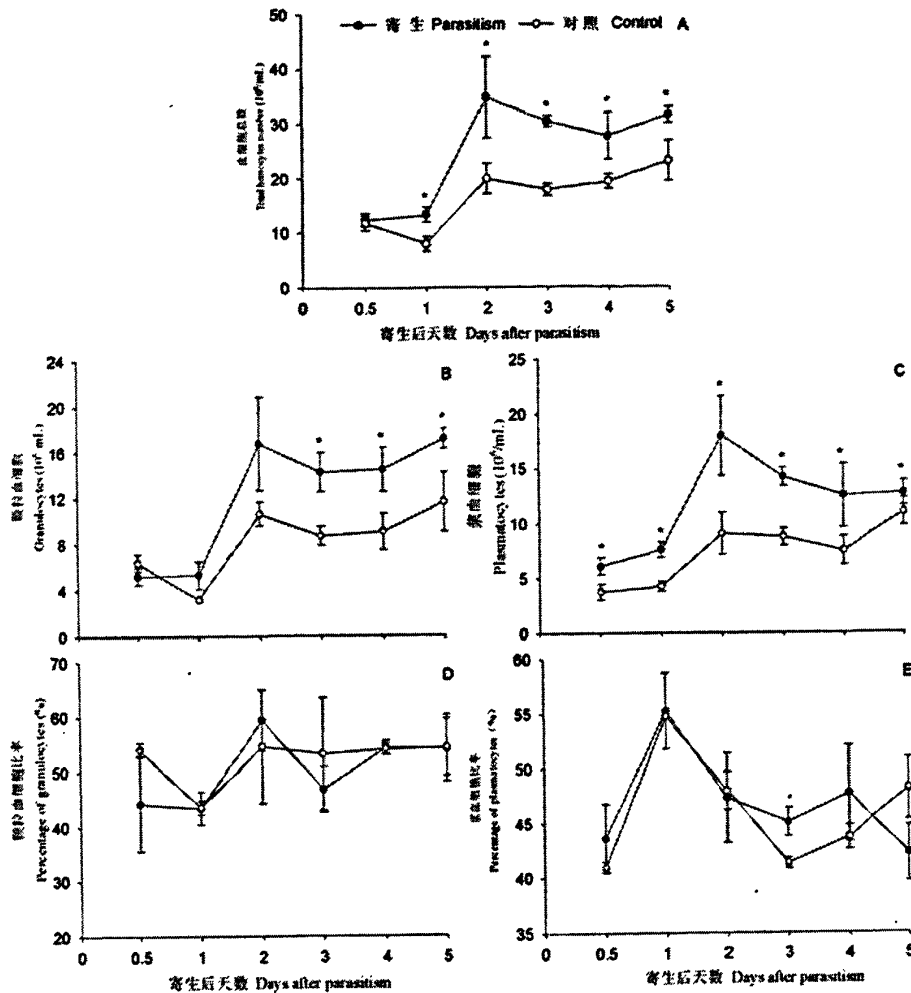


图 4.1 二化螟被二化螟盘绒茧蜂寄生后其血细胞总数、颗粒血细胞和浆血细胞数量和比率的变化

Figure 4. 1 Changes in total hemocyte number (THC), number and percentage of granulocytes and plasmotocytes accounting for THC in *Chilo suppressalis* larvae after parasitism by *Cotesia chilonis*

A、B、C、D、E:血细胞总数、颗粒血细胞数、浆血细胞数、颗粒血细胞比率、浆血细胞比率。A, B, C, D and E: total hemocyte number (THC), granulocyte number, plasmotocyte number, percentages of granulocytes and plasmotocytes accounting for THC. *表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经t测验差异达显著水平 (P<0.05)。*means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t-test (P<0.05).

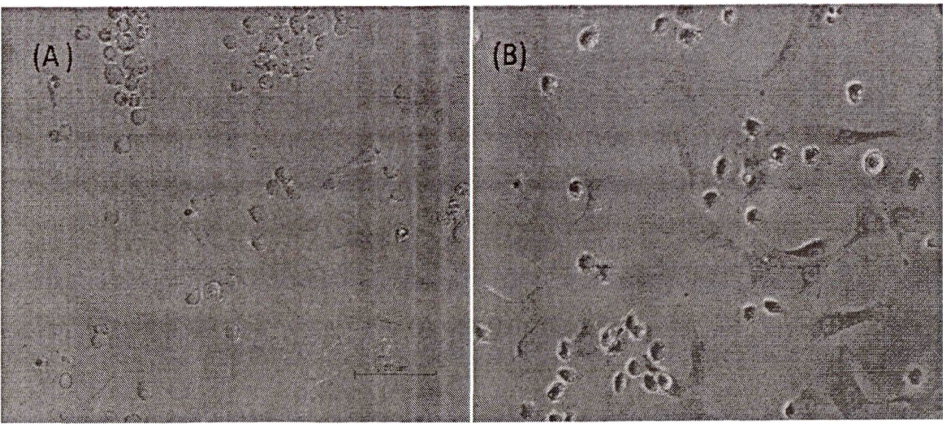


图 4.2 二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主二化螟幼虫血细胞延展能力的影响
A 被寄生后的二化螟幼虫血细胞延展率受到抑制；B 正常二化螟幼虫血细胞体外培养后，出现延展现象

Figure 4.2 Effect of parasitization on spreading of hemocytes in *Chilo suppressalis* larvae after parasitism by *Cotesia chilonis*
A Spreading of hemocytes from parasitized *Chilo suppressalis* larvae was inhibited; B Hemocytes from non-parasitized *Chilo suppressalis* larvae extended with large pseudopods ;

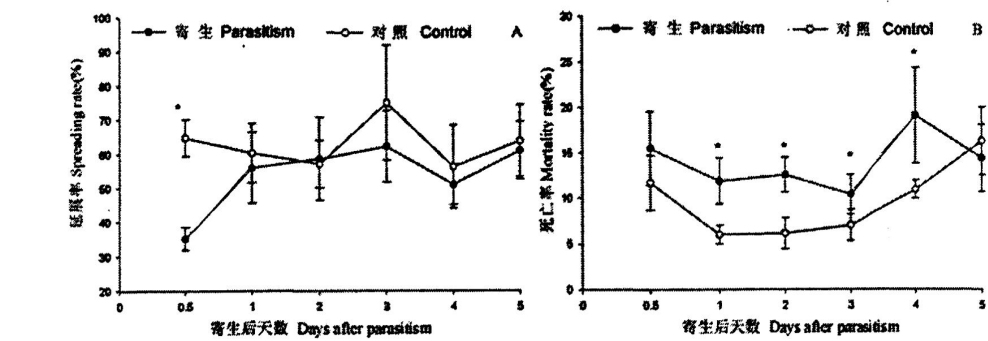


图 4.3 二化螟被二化螟盘绒茧蜂寄生后其血细胞延展率（A）和死亡率（B）的变化

Figure 4.3 Changes in the spreading rate and mortality of hemocytes in *Chilo suppressalis* larvae after parasitism by *Cotesia chilonis*
*表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经 t 测验差异达显著水平 ($P<0.05$). *means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t -test ($P<0.05$).

3.3 寄生对二化螟幼虫血细胞吞噬能力的影响

结果如图 4.4 所示。二化螟盘绒茧蜂的寄生行为可显著影响二化螟幼虫血细胞的吞噬能力，寄生后二化螟幼虫血细胞的吞噬能力多较未寄生的明显较低，并呈现先降后升趋势，其中寄生后第 2~4d 差异达显著，并在寄生后第 3d 达最低。

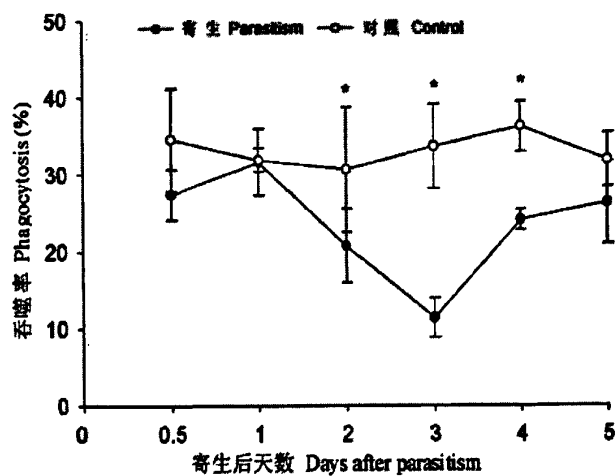


图 4.4 二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后血细胞吞噬能力的变化

Figure 4.4 Changes of phagocytic capability of hemocytes in *Chilo suppressalis* larvae after parasitism by *Cotesia chilonis*

*表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经t测验差异达显著水平 ($P<0.05$).

*means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t-test ($P<0.05$).

3.4 寄生对二化螟幼虫血细胞包囊能力的影响

结果如图 4.5 所示。二化螟盘绒茧蜂的寄生行为可显著影响二化螟幼虫血细胞的包囊能力。寄生后二化螟幼虫血细胞包囊能力呈现先下降后升高的趋势，总体上寄生后二化螟幼虫血细胞包囊能力均低于同期未寄生幼虫，并在寄生第 1-5 d 后达到显著性差异。

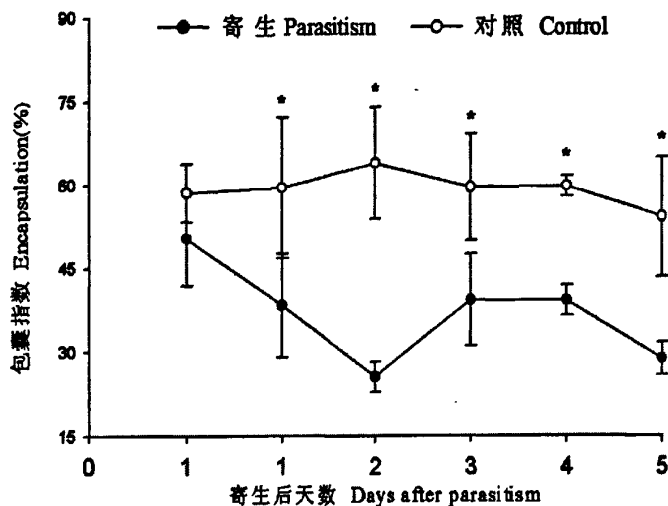


图 4.5 二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后血细胞包裹能力的变化

Figure 4.5 Changes of encapsulation capability of hemocytes in *Chilo suppressalis* larvae parasitism by *Cotesia chilonis*

*表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经 t 测验差异达显著水平 ($P<0.05$). *means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t -test ($P<0.05$).

4 讨论

昆虫血腔中血细胞数量的变化由造血器官中血细胞的增殖和分化情况决定,这一过程由许多转录和信号传导因子控制 (Meister, 2004)。寄生蜂能调控这些转录和信号传导因子基因的转录水平,从而扰乱寄主血细胞的正常增殖和分化,最终导致寄主血细胞数量和比例的改变。寄生蜂寄生寄主后,引起寄主血细胞数量和组成发生变化是其中一个主要的生理特征。不同的寄生蜂—寄主体系所引起的寄主血细胞数量和组成的变化并非完全一致。在有的寄生蜂—寄主体系中,寄生能够引起寄主血细胞数量增加 (杭三保等, 1991; Strand等, 1991; Kitano, 1986; Stoltz等, 1986; 张忠等, 2005; 郇卫弟等, 2006; Cai等, 2004) 而在有的体系中,寄生则导致血细胞数量的下降 (Vinson, 1971; David等, 1987); 有的寄生则导致寄主血细胞数量呈现不规则变化 (Strand等, 1991; Guzo等, 1987; 刘奎等, 2008)。还有些寄主被寄生蜂寄生后,寄主血细胞的数量并无显著变化 (Hu

等, 2003)。从本文结果来看, 二化螟盘绒茧蜂寄生引起寄主二化螟幼虫血细胞数量增加, 说明二化螟盘绒茧蜂进入二化螟体内后能引起寄主的免疫反应, 诱导寄主血细胞的形成。与此同时, 二化螟盘绒茧蜂寄生二化螟幼虫引起寄主的血细胞死亡率高于同期未寄生幼虫, 而寄主的血细胞数量和死亡率与寄主的免疫能力密切相关。因此推测寄主二化螟幼虫被寄生后能够通过增加其本身血细胞的数量来提高自身免疫反应能力, 但二化螟盘绒茧蜂则能通过导致寄主二化螟幼虫血细胞死亡来一定程度上抑制寄主的免疫防御反应。

大多数侵入虫体的细菌都是由吞噬作用而清除的(Marmaras 等, 2009)。昆虫血细胞对于不同的细菌其吞噬效率是不同的, 在不同种类昆虫中, 吞噬细胞类型也不同。鳞翅目昆虫中, 吞噬细胞主要是颗粒血细胞和浆血细胞(Lavine 等, 2002), 并且在鳞翅目昆虫中, 颗粒血细胞是最具吞噬活性的血细胞(Tojo 等, 2000)。鞘翅目某些种类中类绛色细胞也有吞噬能力(Giglio 等, 2008), 果蝇中浆血细胞则是主要的吞噬细胞(Giglio 等, 2008)。被二化螟盘绒茧蜂寄生后, 二化螟幼虫血细胞的吞噬能力呈现不同程度降低, 表明二化螟盘绒茧蜂寄生可以对寄主血细胞的吞噬作用产生不利影响。由于二化螟盘绒茧蜂卵体积较大, 并不足以被寄主血细胞所吞噬, 因此, 寄生蜂抑制寄主血细胞吞噬作用的内在机理及其与寄生蜂对寄主免疫抑制机制之间的关系有待进一步明确。

昆虫血细胞的包囊是颗粒血细胞和浆血细胞粘着于异物表面的囊鞘结构, 其形成涉及血细胞接触异物后血细胞延展和粘附的性能改变, 该过程受信号分子、粘附分子以及同源接受因子的调控 (Lavine & Strand, 2002)。寄生蜂之所以能抑制寄主血细胞的包囊, 主要是因其活性寄生因子能与调控血细胞延展和粘附性能的因子互作, 破坏血细胞正常的延展和粘附能力, 从而使寄主血细胞包囊能力丧失。昆虫血细胞包囊反应通常需要不同种类的血细胞协作才能完成。颗粒血细胞和浆血细胞的粘附能力是实现昆虫细胞包囊反应的基本条件(Johansson, 1999)。而血细胞的延展功能与其包囊能力是相关的, 当延展能力得到恢复时, 血细胞即可包囊外物(Asgari 等, 1996; Yu 等, 2007)。寄生蜂之所以能抑制寄主血细胞的包囊, 可能主要是因其活性寄生因子能与调控血细胞延展和粘附能力的因子互作, 破坏血细胞正常的延展和粘附能力, 从而使寄主血细胞包囊能力丧失。二化螟盘绒茧蜂寄生能导致寄主血细胞的延展能力与包囊能力显著降低, 使得侵入的蜂卵能成功逃避被寄主血细胞包囊, 从而提高寄生蜂存活率。

第五章 二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主体液免疫的影响

1 引言

昆虫的体液免疫系统是昆虫免疫系统的重要组成部分。昆虫体液免疫依赖血淋巴中的先天性免疫和后天性免疫两种因子。先天性免疫因子包括酚氧化酶、溶菌酶、凝集素、抑血细胞聚集素等,后天性免疫因子需要人工或自然诱导,如抗菌肽和抗真菌肽等(Hoffmann, 1995)。

寄生蜂破坏寄主体液免疫反应最常见的是抑制寄主血淋巴的黑化。黑化反应是一个复杂的级联反应,级联反应的末端为酚氧化酶激活酶原,通过限制性水解被激活产生酚氧化酶激活酶,酚氧化酶激活酶水解酚氧化酶原形成酚氧化酶(酚氧化酶原的激活是一个丝氨酸级联反应,需要一系列丝氨酸蛋白酶的参与),酚氧化酶再将酪氨酸经羟基化和氧化后形成醌(黑色素前体),最终产生黑化反应,且该级联反应受丝氨酸蛋白酶抑制剂或其它蛋白酶抑制剂的调节。因此,寄生蜂抑制寄主血淋巴黑化产生主要是通过调节与黑化反应有关基因的转录水平来实现。

本章内容旨在通过检测二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后体液免疫各项指标的变化,研究和探讨二化螟盘绒茧蜂寄生对二化螟的体液免疫的影响。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

见第二章2.1。

2.2 酚氧化酶活性的测定

参照蔡峻(2001)的方法,于寄生后0.5, 1, 2, 3, 4和5d,分别收集单头寄生幼虫和同期未寄生幼虫的血淋巴放入冰浴的Eppendorf管内,从中各取血5 ul,分

别置于装有90 双蒸水的Eppendorf管内, 4℃ , 8 000 r/min离心5 min, 将各管中的上清液分别取出, 4℃下静置1 h. 另取Eppendorf管并加入以磷酸缓冲液(0. 1 mol/L, pH 6. 8)配置的0. 02 mol/L的多巴胺溶液, 分别加入静置后的上清液60ul, 振荡混匀。室温下静置5 min, 用酶标仪测定样品OD 490, 并以多巴胺溶液作为对照。以每分钟内单位积样品OD 值变化0.001为一个酶活单位(u)。重复3次。

2.3 黑化作用

分别于寄生后0. 5, 1, 2, 3, 4和5 d取二化螟幼虫血淋巴, 加入到含有一定提及的PBS溶液的eppendorf 管中, 室温下放至30min, 观察血淋巴颜色的变化, 当颜色由白色变为黑褐色则记为正常黑化; 而仍保持原来颜色的则记为黑化反应被抑制, 计算发生黑化反应虫数所占的百分率。每次10头试虫。

2.4 血淋巴的抑菌实验

分别收集寄生后0. 5, 1, 2, 3, 4和5 d取二化螟幼虫血淋巴, 以血细胞培养基、菌液(大肠杆菌菌液OD600 值为0.5)、血淋巴按体积比为10:9:1 的比率混合后, 30℃孵育, 1h, 4h后测定OD600 值。

2.5 感菌能力研究

用0.02%的吐温20 配制0.1%的白僵菌菌液(来自浙江大学生命科学院冯明光老师实验室, 孢子悬浮液浓度为 3.2×10^7 个/ml)。用毛笔将供试幼虫连续蘸入菌液3 次, 随后放入盛有人工饲料的培养皿中饲养, 实验于室温28℃, 相对湿度为85%的条件下进行, 每处理30 头幼虫, 设3 个重复。同期未寄生幼虫作为对照。观察死亡率。

3. 结果

3.1 寄生对寄主 PO 活性的影响

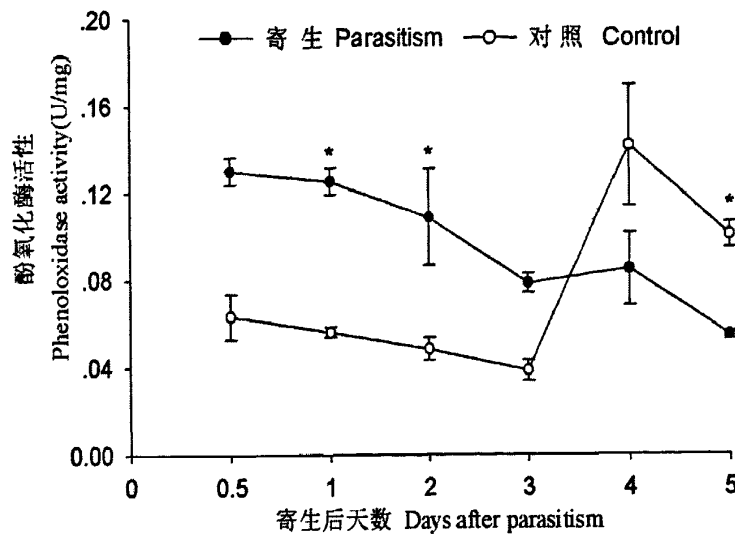


图 5.1 二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后血淋巴酚氧化酶活性的变化

Figure 5.1 Changes of the phenoloxidase activity of hemolymph in *Chilo suppressalis* larvae parasitism by *Cotesia chilonis*

*表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经 t 测验差异达显著水平 ($P<0.05$). *means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t -test ($P<0.05$).

结果如图 5.1 所示。寄生早期寄生对二化螟幼虫血细胞的酚氧化酶活性有明显的影响，寄生后酚氧化酶的活性高于同期未寄生幼虫，其中寄生后第 1~2 d 酶活性显著高于未寄生。然而，寄生后期寄生后酚氧化酶的活性则低于同期未寄生幼虫，并在寄生后第 5 d 的差异达显著水平。

3.2 寄生对寄主二化螟血淋巴黑化作用的影响

从图 5.2 中我们可以看出，二化螟盘绒茧蜂寄生后寄主二化螟幼虫的血淋巴的黑化作用受到了一定程度的抑制，但并不产生显著性差异。前几天的抑制作用比较明显，黑化速度比较慢，但后来随着寄生时间的增加，效果越来越不明显，在第 5 天两者已无差别。

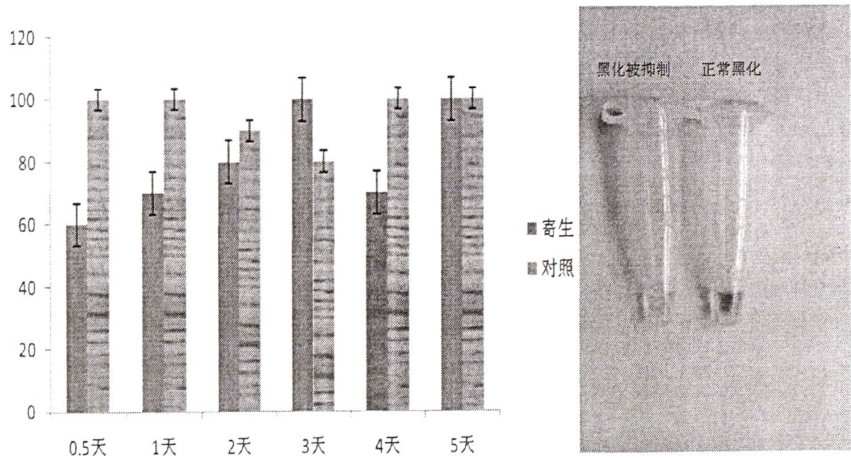


图 5.2 二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后血淋巴黑化作用的变化
Figure 5.2 Changes of the melanization of hemolymph in *Chilo suppressalis* larvae parasitism by *Cotesia chilonis*

3.3 寄生会二化螟幼虫血淋巴抑菌能力的影响

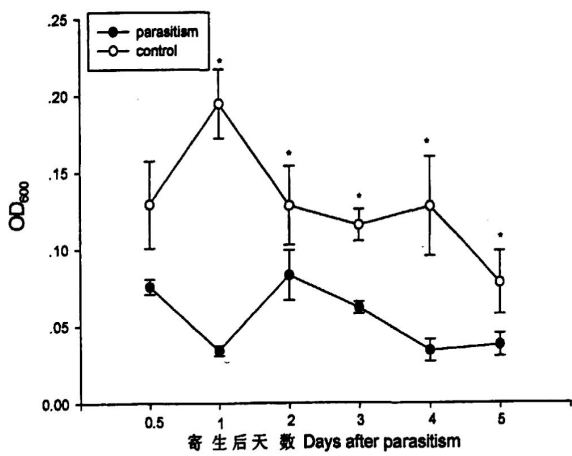


图 5.3 二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后血淋巴抑菌能力的变化
Figure 5.3 Changes of the bacateriostatic ability of hemolymph in *Chilo suppressalis* larvae parasitism by *Cotesia chilonis*

*表示同一指标在同一时间时寄生与未寄生数值间经t测验差异达显著水平 ($P<0.05$)。*means that there is significant difference between parasitized and unparasitized larvae for the same parameter measured in the same time after parasitism, compared by t-test ($P<0.05$).

由图5.3我们可以看出，寄生后血淋巴的抑菌能力降低，并在1-5d 达到显著差异。可见寄生抑制了幼虫血淋巴的抑菌反应。

3.4 寄生对二化螟感菌能力的影响

被二化螟盘绒茧蜂寄生后二化螟在感染白僵菌后的死亡率为 $80\pm 3.3\%$,显著高于对照($46.67\pm 6.7\%$),可见寄生后二化螟的感菌能力增强。

4 讨论

昆虫体液免疫包括抗菌肽,抗菌蛋白和其它免疫相关分子活性体的合成(Giglio等, 2008; Bogdan等, 2000; Lowenberger, 2001; Vass & Nappi, 2001; Borges等, 2008)及调控血淋巴凝结或黑化的复杂酶链活化反应(Muta & Iwanaga, 1996; Gillespie & Kanost, 1997)。在不同的寄主-寄生蜂系统中,寄生蜂对酚氧化酶的作用是不同的。如菜粉蝶*Pieris rapae*被微红绒茧蜂*Cotesia rubecula*寄生后其血淋巴内酚氧化酶酶活显著降低(Asgari等, 2003), Hartzler等(2005)也发现被麦蛾柔茧蜂*Habrobracon hebetor*寄生后的印度谷螟*Plodia interpunctella*的血淋巴内酚氧化酶活性明显降低,类似现象在烟草天蛾*Manduca sexta*-集聚绒茧蜂*Cotesia congregata*(Beckage等, 1990), 粉纹夜蛾*Trichoplusia ni*-镶颚茧蜂*Hyposoter exiguae*(Stoltz & Cook, 1983), 烟芽夜蛾*Heliothis virescens*-黑唇姬蜂*Campoletis sonorensis*(Sroka & Vinson, 1978)等系统中也有发现。而在椰扁甲啮小蜂(*Tetrastichus brontispae*)—椰心叶甲(*Brontispa longissima*)蛹系统中,寄生蛹酚氧化酶活性明显高于同期未寄生蛹(刘奎等, 2008),同样,家蚕追寄蝇(*Exorista sorbillans*)寄生家蚕后其酚氧化酶活性也是升高的(李季生等, 2006)。本文结果显示,寄生后早期寄主的酚氧化酶活性升高,从而产生大量血细胞致毒物质,使其与寄生物接触的血细胞坏死,这可能也是二化螟排除侵入体内寄生蜂的一种方法。

寄生后寄主二化螟血淋巴无法正常黑化是与二化螟盘绒茧蜂的寄生造成寄主幼虫酚氧化酶活性被抑制密切相关。这在其他多个寄主-寄生蜂系统中也都有发现,如烟草天蛾*Manduca sexta*-集聚绒茧蜂*Cotesia congregata*(Beckage等, 1990)、烟芽夜蛾*Heliothis virescens*-黑唇姬蜂*Campoletis sonorensis*(Shelby等, 2000)、棉铃虫*Helicoverpa armigera*-棉铃虫齿唇姬蜂*Campoletis chlorideae*(Stoltz & Cook, 1983)等。二化螟幼虫被盘绒茧蜂寄生后,血淋巴黑化能力受到显著

抑制,但由于酚氧化酶活性在寄生后反而不同程度升高,因此二化螟盘绒茧蜂抑制寄主二化螟血淋巴黑化作用可能涉及其他作用途径。

寄生蜂的成功寄生往往会对寄主昆虫的免疫防御系统造成严重影响,进而影响到寄主昆虫对其它病原微生物的抵抗能力。将二化螟血淋巴用于细菌培养时,细菌的浓度高低在一定程度上与血淋巴中抗菌类物质的浓度大小相关。抗菌类物质是昆虫生理系统中重要的后天性免疫因子之一。本实验发现寄生后寄主的血淋巴的抑菌效果显著弱于对照,这与小菜蛾*Plutella xylostella* - 颈双缘姬蜂*Diadromus collaris* 系统(郦卫弟, 2005)及番茄夜蛾*Lacanobia oleracea* - 瘤姬蜂*Pimpla hypochondriaca* 系统(Marris等, 1999)中的研究结果是相一致的。

第六章 二化螟盘绒茧蜂毒液和卵萼液对二化螟幼虫主要免疫反应的影响

1 引言

寄生蜂能成功寄生寄主昆虫,主要取决于其寄生因子对寄主免疫系统的抑制作用。寄生蜂的寄生因子主要包括 PDV、毒液、类病毒颗粒、卵巢蛋白、畸形细胞及寄生蜂幼虫分泌物等 (Asgari & Schmidt, 1994; Jones, 1996; Luckhart & Webb, 1996; 叶恭银 & 胡萃, 1998; Beckage, 1998; Vinson 等, 1998; Hochuli 等, 1999; Kinuthia 等, 1999; Shelby & Webb, 1999; 尹丽红, 2001; Rivers 等, 2002; Beckage & Gelman, 2004)。寄生因子通过相互间协同作用,改变寄主血细胞总数和各类血细胞的比例,抑制血细胞的延展与粘附能力,或破坏血细胞骨架而降低血细胞的包囊能力等,最终攻克寄主昆虫的细胞免疫系统 (Stettler 等, 1998; Beckage & Gelman, 2004; Asgari, 2006)。

血细胞的包囊作用一直是细胞免疫的重要组成部分之一,所以血细胞包囊的形成过程及其调控机制的研究一直备受关注,而血细胞的包囊作用与血细胞的延展能力息息相关,一般认为鳞翅目中参与包囊反应的主要血细胞类型是颗粒血细胞和浆血细胞:当外物侵入虫体时,颗粒血细胞迅速粘附在入侵物的表面,继而浆血细胞趋向颗粒血细胞,颗粒血细胞再附在浆血细胞的外面从而形成包囊 (Vass & Nappi, 2001; Schmidt 等, 2001)。在对寄生蜂寄生引起的寄主酚氧化酶活性变化的研究表明:在拥有 PDV 的寄生蜂中,PDV 是调控酚氧化酶活性的主要因子(Beckage 等, 1990; Shelby 等, 2000; 白素芬等, 2003; Kim 等, 2004)。但有时毒液也能对寄主酚氧化酶活性引起明显的调控作用 (Asgari 等, 2003; Zhang 等, 2004)。本章拟通过显微注射的方法研究二化螟盘绒茧蜂毒液、萼液以及混合物对二化螟幼虫主要免疫反应的影响。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

见第二章 2.1.

2.2 寄生蜂成蜂生殖系统各部分的解剖

收集羽化后 2 天的二化螟盘绒茧蜂的雌蜂置 Olympus 解剖镜下, 在已灭过菌的 PBS(pH 7.4) 中用解剖针轻轻拉出生殖系统, 取下卵萼和毒液器官, 分别移至冰浴并含有一定体积 PBS 缓冲液(pH7.4) 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, 尔后, 以 PBS 缓冲液调节各组成部分的浓度, 使每 1 μ l PBS 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。

将等量的毒液粗提液和萼液粗提液混合, 用相同方法调节混合物浓度为每 1 μ l PBS 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。

2.3 二化螟盘绒茧蜂毒液、萼液以及混合物的显微注射

- (1) 将直径约为 0.9mm 的毛细管一端用拉针仪拉成直径约为 0.85mm 的玻璃微针, 毛细管的另一端连接在微操作系统上, 接口处用封口膜封死。注射所用工具在注射前全部放在超净工作台中在紫外线下灭菌 15min。
- (2) 6 孔板灭菌; 毒液、萼液以及混合物过滤灭菌; 二化螟体表灭菌。
- (3) 在 6 孔板中加入适当大小的二化螟人工饲料。
- (4) 显微注射在解剖镜下进行, 用镊子轻轻夹住二化螟幼虫(尖端用封口膜缠住, 以免弄伤虫体), 用玻璃微针吸取 2 μ l 的毒液、萼液以及混合物, 从幼虫节间膜注射到事先体表灭菌的 4 龄二化螟幼虫血腔内, 注射完成后将毛细管拔出并在注射处轻轻涂抹凡士林, 以免伤口流血过多或幼虫感染死亡。注射 PBS 的幼虫作为对照。
- (5) 将注射后的二化螟放入已加入人工饲料的 6 孔板中, 橡皮筋固定, 置于无

菌的环境中饲养。

2.4 毒液、萆液及两者混合物对二化螟幼虫活体内血细胞数量的影响

分别于注射毒液、萆液及两者混合物后 0.5、1、2、3、4、5 d 取单头二化螟幼虫血淋巴镜检。取血时, 在 Parafilm 膜上用灭菌后的眼科剪剪去幼虫的腹足, 待血淋巴自然流出吸取 5 μ l 的血淋巴, 置入 Eppendorf 离心管中, 并加入 10 μ l 抗凝液 (100mL 蒸馏水中含 NaCl 0.9 g、KCl 0.942 g、CaCl₂ 0.082 g、EDTA 2 g) 稀释。在相差显微镜下, 以血球计数板统计血细胞总数 (200 x)。每次检查注射毒液、萆液及两者混合物的 4 龄二化螟幼虫各 3 头, 并重复 3 次。注射 PBS 的幼虫作为对照。

2.5 毒液、萆液及两者混合物对血细胞延展力和存活率的测定

分别取注射毒液、萆液及两者混合物后 0.5、1、2、3、4、5 d 的单头二化螟幼虫血细胞 5 μ l, 加入 44 μ l Grace 昆虫细胞培养基 (上海英骏生物技术有限公司) 和 1 μ l PTU, 培养 4 h 后置于倒置显微镜下观察、考查延展和未延展的浆血细胞和颗粒血细胞的数量, 浆血细胞变为梭形或其它不规则形状计数为延展, 颗粒血细胞以细胞伸出伪足计数为延展, 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。重复 3 次。注射 PBS 的幼虫作为对照。

2.6 毒液、萆液及两者混合物对血细胞包囊作用的影响

分别取注射毒液、萆液及两者混合物后 0.5、1、2、3、4、5 d 的单头二化螟幼虫血细胞, 吸取 10 μ l 的血淋巴加入到已放有 38 μ l Grace 昆虫细胞培养基的 96 孔细胞培养板中, 加入 1 μ l 的苯基硫脲 (PTU) 溶液和 1 μ l 的微珠 Sephadex A-50 (北京拜尔迪生物公司), 使微珠数量在 15-30 个左右, 并用 Parafilm 膜封好,

放在 27℃ 恒温箱内, 于 12 h 后观察包囊形成情况, 并计算包囊指数。包囊指数 (%) = $\frac{[\sum (\text{某一包囊级数} \times \text{该包囊级别的 Sephadex A-50 微珠数目}) / (\text{供试 Sephadex A-50 微珠的总数} \times 5)] \times 100}{}$ 。重复 3 次。注射 PBS 的幼虫作为对照。

2.7 毒液、萼液及两者混合物对二化螟酚氧化酶活性的影响

分别取注射毒液、萼液及两者混合物后 0.5、1、2、3、4、5 d 的单头二化螟幼虫血淋巴 5 μl 置于装有 90 μl 去离子水的冰浴的 Eppendorf 管内, 4℃, 8 000 r/min 离心 5 min, 将各管中的上清液分别取出, 4℃ 下静置 1 h。另取 Eppendorf 管加入 50 μl 静置后的上清液, 并加入等体积溶液浓度 125mg/ml 的多巴胺溶液, 混匀。室温下静置 5 min, 用酶标仪测定样品 OD₄₉₀。多巴胺溶液作为对照。以 5-10 min 内单位积样品 OD 值变化 0.001 为 1 个酶活单位(U)。重复 3 次。注射 PBS 的幼虫作为对照。

2.8 毒液和卵萼液对二化螟幼虫离体血细胞延展和存活影响的测定

以 75% 酒精消毒二化螟幼虫体表, 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 5 μl 分别加到每孔含 44 μl Grace 昆虫细胞培养基 (上海英骏生物技术有限公司) 和 1 μl PTU 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 μl 的量分别加入 3 个不同孔穴中。设仅加 2 μl PBS 缓冲液为对照。接着, 置 27℃ 细胞培养箱中培养, 分别于 1 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血细胞数量, 并计算两种血细胞的延展率。其中, 延展率 (%) = $\frac{\text{延展的血细胞数量}}{\text{考查的血细胞的总数量}} \times 100$ 。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。加入 PBS 的作为对照。

2.9 毒液和卵萼液对二化螟幼虫离体血细胞血细胞包囊作用的影响

将二化螟幼虫血细胞加入到含 Grace 昆虫细胞培养基的 96 孔细胞培养板中,

再将生殖系统各组成部分提取液按 2 μ l 的量分别加入 3 个不同孔穴中, 并加入微珠 Sephadex A-50 (北京拜尔迪生物公司), 使微珠数量在 15-30 个左右, 并用 Parafilm 膜封好, 放在 27℃ 恒温箱内培养, 加入 PBS 的作为对照。培养 12 h 后置 Leica 倒置显微镜下考查各处理孔穴中不同包囊级别的 Sephadex A-50 微珠粒数, 计算包囊指数。

3 结果

3.1 注射毒液、萼液及两者混合物对二化螟幼虫活体内血细胞数量的影响

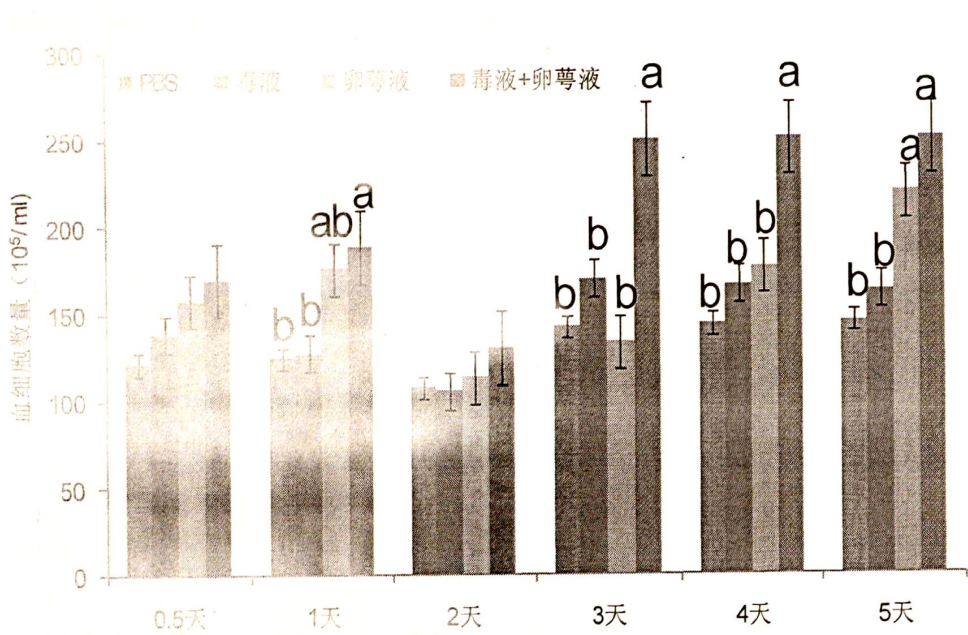


图 6.1 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对二化螟幼虫血细胞数量的影响, 图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.1 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on THCs of *Chilo suppressalis* larvae, different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

对二化螟 4 龄幼虫注射二化螟盘绒茧蜂毒液和卵萼液混合物可明显诱导寄主血细胞数量升高, 其中在注射后第 3d 与对照及单独注射毒液或卵萼液的差异达显著水平(图 6.1)。单独注射毒液或卵萼液对寄主血细胞数目的影响多不明显, 但在注射后第 5d 注射卵萼液的寄主血细胞数目与注射混合物的相当, 比对照与

单独注射毒液的则显著为高。

3.2 注射毒液、萼液及两者混合物对二化螟幼虫活体内血细胞延展力和存活率的影响

由图 6.2 可知，活体注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液或两者混合液均可显著抑制二化螟幼虫血细胞的延展率。与对照相比，注射毒液后二化螟幼虫血细胞的延展率均受到显著的抑制，并达到显著性差异；注射卵萼液后二化螟幼虫的延展率也受到显著的抑制；同样，注射同等浓度的混合物抑制也达到显著性水平。并且，在开始的 0.5~1 天，注射毒液后血细胞的延展率要低于注射卵萼液的，后来注射毒液的延展率逐渐上升，高于同等注射卵萼液的血细胞的延展率，并且在第 0.5 天时，注射毒液的血细胞的延展率与注射混合物的达到显著性差异，但后来差异并不显著，也就是说，开始阶段注射毒液的增效作用比较大，后来这种作用慢慢减弱，总之，注射混合物对二化螟幼虫血细胞的延展能力抑制最强。

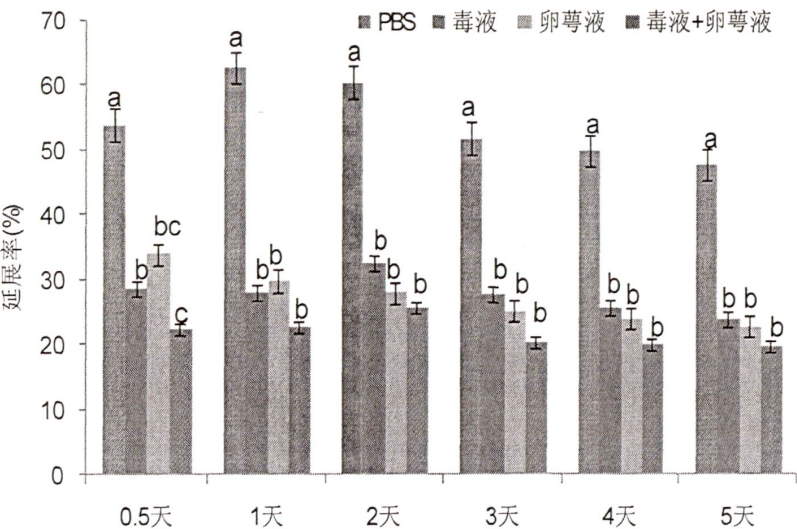


图 6.2 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对二化螟幼虫血细胞延展率的影响，图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.2 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the spreading rate of *Chilo suppressalis* larvae, different capital letters show significantly difference($P<0.05$)。

由图 6.3 可以看出，活体注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液或两者混合液对二化螟幼虫血细胞死亡率的影响与其对血细胞延展率的相似。与注射 PBS 的对

照相比,注射毒液、萼液及两者混合物后血腔中血细胞的死亡率呈上升趋势。其中,注射毒液与对照相比,除第2和4天外,均达到显著性差异;注射卵萼液的与对照相比,除第1天外其他时间均出现显著性差异;二注射混合物的与对照相比均达到显著性差异。另外,我们可以看到,除第0.5天外,注射卵萼液的血细胞的死亡率均高于同期注射毒液的,但两者都小于注射混合物的血细胞的死亡率。

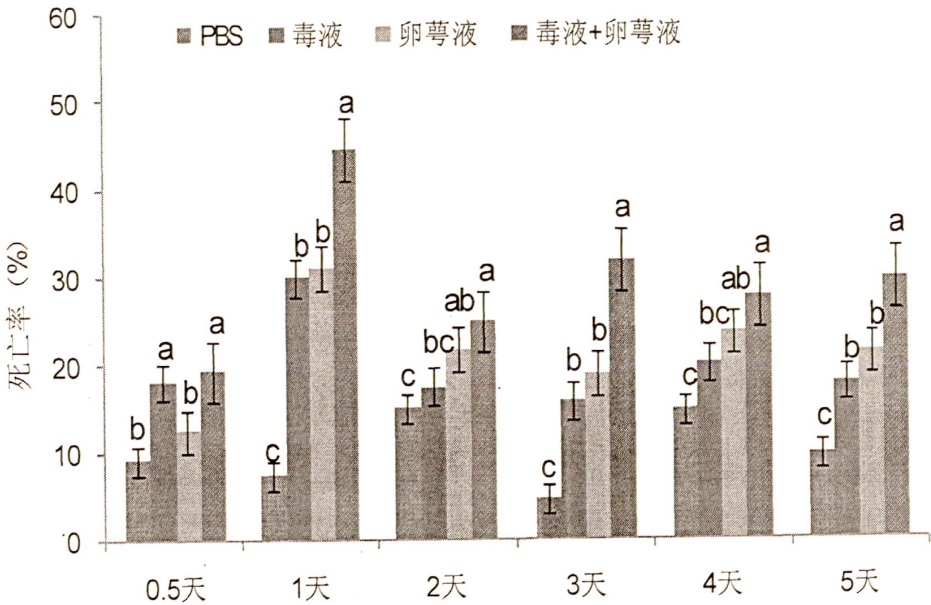


图 6.3 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对二化螟幼虫血细胞死亡率的影响, 图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure6.3 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the mortality of *Chilo suppressalis* larvae, different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

3.3 注射毒液、萼液及两者混合物对二化螟幼虫活体内血细胞包囊能力的影响

由图 6.4 可以看出,与注射 PBS 的对照相比,注射毒液、萼液及两者混合物后血细胞的包囊能力降低。其中,在 0.5 天,注射毒液、萼液及两者混合物后血细胞的包囊能力都与对照产生显著性差异,在 1 天时,注射毒液后血细胞的包囊能力都与对照产生显著性差异,但是注射萼液及两者混合物后血细胞的包囊能

力都与对照产生显著性差异，在第二天之后，虽然注射毒液、卵萼液及两者混合物后血细胞的包囊能力降低，但是并不产生显著性差异。总体而言，注射混合物后血细胞的包囊能力最弱，其次为注射卵萼液，注射毒液的血细胞的包囊能力最强。而且随着时间的延长，与对照相比，包囊能力的差异越来越小，注射毒液、卵萼液及两者混合物后血细胞的包囊能力呈上升趋势。

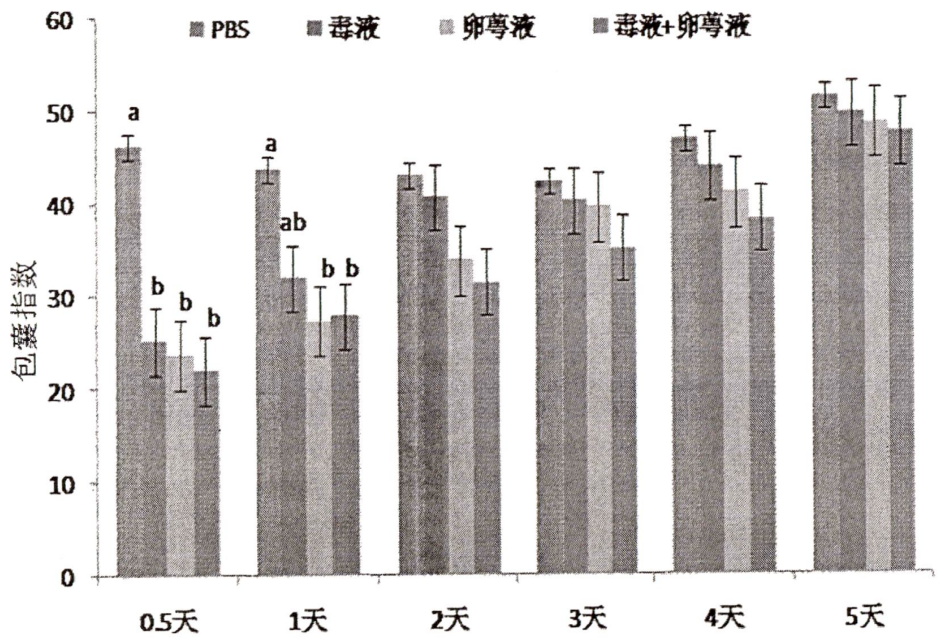


图 6.4 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对二化螟幼虫血细胞包囊能力的影响，图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.4 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the encapsulation capability of *Chilo suppressalis* larvae, different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

3.4 注射毒液、萼液及两者混合物对二化螟幼虫酚氧化酶活性的影响

由图 6.5 我们可以看出，活体注射二化螟盘绒茧蜂不同寄生因子对寄主二化螟血淋巴中的酚氧化酶活性存在明显影响，且呈现不同的日变化。在注射不同寄生因子后 0.5d，寄主酚氧化酶活性明显增高；注射后第 1d：酶活都出现下降，其中单独注射毒液和卵萼液的均明显低于对照；第 2d：注射混合液的酶活继续降低，而单独注射毒液和卵萼液的酶活则有一定升高，其中注射混合液和毒液的与对照相当，注射卵萼液的明显高于对照；第 3d：酶活都出现升高，且都明显

高于对照；第 4d: 注射混合液的酶活出现降低，明显低于对照，而单独注射毒液和卵萼液的则继续升高，均明显高于对照；第 5d: 酶活都下降，其中以注射混合液和卵萼液的均显著低于对照，而单独注射毒液的则略低于对照。

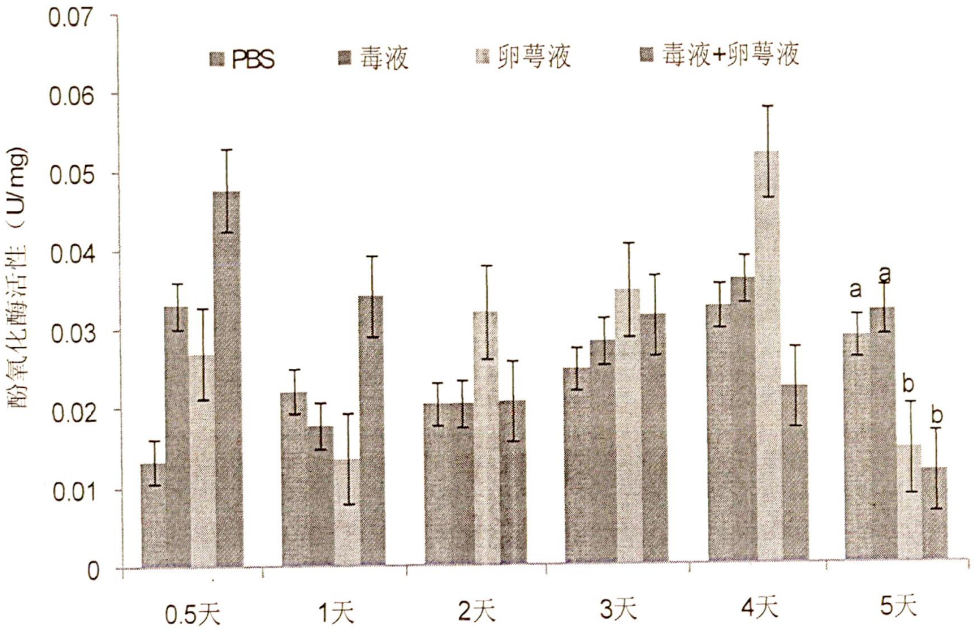


图 6.5 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对二化螟幼虫血淋巴酚氧化酶活性的影响，图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.5 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the he phenoloxidase activity of hemolymph of *Chilo suppressalis* larvae, different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

3.5 毒液和卵萼液对二化螟幼虫离体血细胞延展和存活影响的测定

离体加入二化螟盘绒茧蜂不同寄生因子能明显降低寄主二化螟血细胞的延展率。其中单独加入毒液和卵萼液共培养 1h 后对血细胞延展率的抑制程度与对照无显著差异，而加入混合液的抑制程度达显著水平；在共培养 4h 后，血细胞抑制程度增大，加入不同寄生因子后的血细胞延展率均显著低于对照，其中以加入混合液的为最低。

加入二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合液共培养均能增加寄主血细胞的死亡率。共培养 1h 后，对照与处理之间并差异不显著，但共培养 4h 后，各处理的血细胞死亡率有增高，其中以单独加入毒液和混合液的显著高于对照。

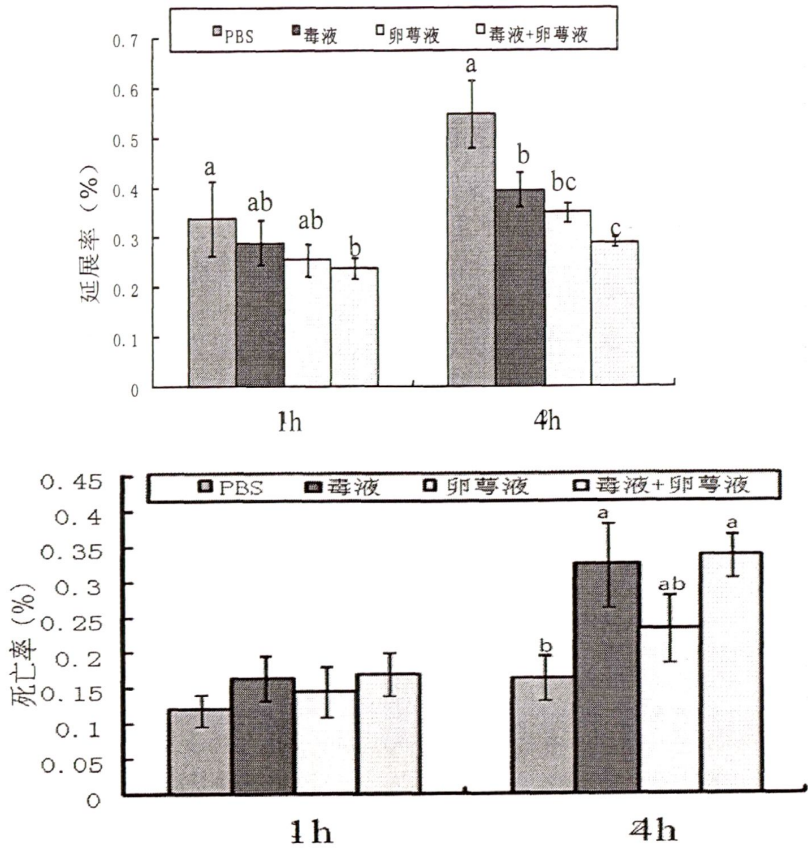


图 6.6 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对离体二化螟幼虫血细胞延展率和死亡率的影响，图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.6 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the spreading rate and mortality of *Chilo suppressalis* larvae in vitro , different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

3.6 毒液和卵萼液对二化螟幼虫离体血细胞包囊作用的影响

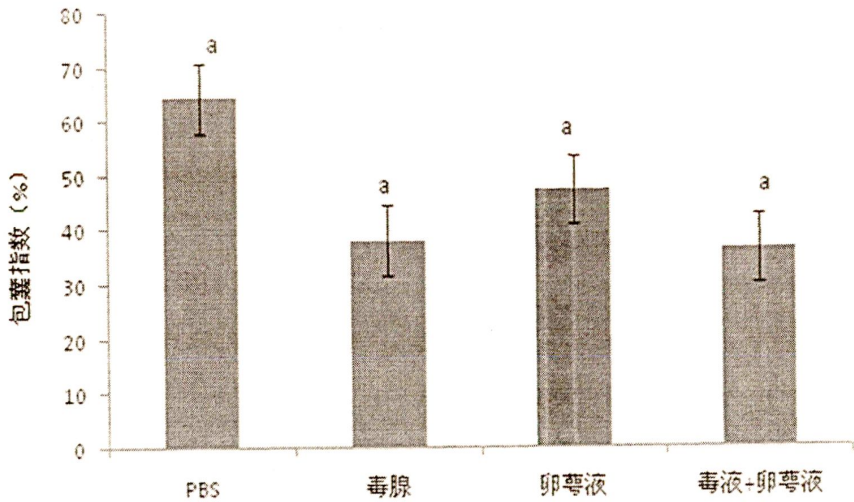


图 6.7 注射二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液及其混合物对离体二化螟幼虫血细胞包囊能力的影响，图中不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

Figure 6.7 Effects of venom/calyx/or mixture of venom and calyx fluid of *Cotesia chilonis* on the encapsulation capability of *Chilo suppressalis* larvae in vitro , different capital letters show significantly difference($P<0.05$).

注：图为同一时间不同处理之间的对比。

培养 12h 后，加入毒液、卵萼液和混合物的血细胞的包囊能力有所下降，但是并不与对照产生显著性差异。但是三者的包囊指数都要小于 50%，而对照的包囊指数要大于 60%，而三者的包囊指数大小依次为：卵萼液 > 毒液 > 混合物。

4 讨论

在寄生蜂寄生的早期，寄生蜂逃避寄主的免疫防御系统通常采用以下 2 种策略：（1）将能抑制寄主免疫防御系统的寄生因子随蜂卵一起注入寄主体内，这些寄生因子主要干扰寄主对蜂卵的细胞和体液免疫作用；（2）蜂卵表面的分子模拟使寄主免疫防御系统不再识别其为外来异物。当前的研究重点多集中在前者，即有关寄生因子的功能及调控机制研究。寄生蜂的寄生因子主要包括存在于卵萼液中的 PDV、毒液和畸形细胞等，其中 PDV 和毒液是来源于雌蜂生殖系统且随蜂卵一起注入寄主体内的重要寄生因子。为探讨这两种寄生因子在寄生蜂突破寄主免疫防御系统中的作用，并排除蜂卵干扰的影响，本文采用活体注射和离体共培

养法分析比较不同寄生因子处理（毒液、卵萼液及两者混合液）对二化螟免疫功能的影响。结果表明，不同二化螟盘绒茧蜂寄生因子处理均能不同程度影响二化螟血细胞数量、延展率、死亡率和包囊作用以及血淋巴酚氧化酶活性等。

注射研究实验表明注射毒液对二化螟幼虫血腔中血细胞的总数几乎不产生显著性影响，二注射同等浓度的卵萼液和混合物则会对血细胞的数量产生显著性差异，此外，注射混合物的二化螟的血细胞的数量要高于注射卵萼液的血细胞数量，由此我们可以看出，毒液对卵萼液有增效作用。

寄生蜂寄生对寄主血细胞数量的影响主要有以下情况：（1）寄生蜂寄生对寄主血细胞数量无显著影响（Hu 等，2003）；（2）寄生蜂寄生可以引起寄主血细胞数量的增加（Strand 等，1991；张忠等，2004；杭三保等，1991；Kitano，1986；郦卫弟等，2004）；（3）寄生蜂寄生引起寄主血细胞数量的下降（Vinson，1971；David 等，1987）。在本实验中，我们可以看出，通过显微注后寄主血细胞的数量是增加的，而在前面的实验中我们可以发现，二化螟盘绒茧蜂寄生二化螟幼虫后，其血细胞总数是上升的，这与前面的寄生实验是相符的。而且，本实验还明确了二化螟盘绒茧蜂的卵萼液能够引起寄主血细胞的明显增加，特别是在毒液的协同作用下这种能力更加明显。

此外，我们可以看到注射毒液、萼液及两者混合物后二化螟幼虫的血细胞延展能力得到了明显的抑制。我们可以看出：（1）毒液在作用的早期对二化螟的血细胞的延展有很明显的抑制作用，但是随着时间的延长，这种抑制作用虽然一直存在，但是有减弱的趋势，说明二化螟的血细胞的延展能力得到了恢复（2）萼液和混合物对血细胞的延展能力有更明显的抑制作用，而且这种作用有一定的持久性，同时混合物的抑制作用更强烈一些。而前人研究表明，注射毒液后寄主血细胞的延展能力的恢复可能是由于毒液免疫抑制功能的丧失或者是血细胞免疫功能的恢复（Stoltz 和 Guzo，1986）。

与对照二化螟幼虫血细胞的包囊能力相比，注射毒液的二化螟幼虫的血细胞的包囊能力在第1天出现显著性差异，但是此后这种抑制作用消失；而注射同等浓度的卵萼液和混合物的抑制作用的抑制作用要持久一些。总体而言，注射毒液、卵萼液和混合物都起到了抑制血细胞包囊能力的作用，但是三者的作用强度依次为混合物、卵萼液、毒液。而注射毒液、卵萼液和混合物后二化螟幼虫的酚氧化酶活性是升高的。

通常情况下, 具有 PDV 的内寄生蜂在调控寄生蜂寄主免疫反应的作用中起主要作用的是 PDV, 而不是毒液 (Asgari, 2006)。在有的寄生蜂-寄主系统中, 毒液几乎没有发挥什么作用, 例如索诺唇齿姬蜂-烟蚜夜蛾系统中, 毒液几乎没有起什么作用 (Webb, 1994)。而再有的寄生蜂-寄主系统中, 寄生蜂的毒液能够对其卵萼液或 PDVs 其增效作用, 例如在粘虫绒茧蜂-粘虫寄生系统中, 单独的毒液对颗粒血细胞没有影响, 但当毒液和卵萼液混合时能抑制血细胞的延展, 最终导致血细胞的溶解 (Wago, 1989)。二化螟盘绒茧蜂毒液对寄主血细胞免疫和体液免疫均有一定作用, 而且与卵萼液一起具有协同增效效果。

在一些寄生蜂-寄主系统中, 寄生蜂毒液蛋白是其 PDV 的感染和基因表达的主要因素, 例如在菜粉蝶微红绒茧蜂毒液中分离出来的一种多肽对 PDVs 在寄主血细胞中的表达来说是必需的 (Zhang, 2004), 同时另外两种毒液蛋白能够与其 PDV 编码的一免疫抑制蛋白协同发挥抑制寄主的免疫反应的功能 (Asgari, 1997; Asgari, 2003), 在多样性如此复杂的寄生蜂群体中, 寄生蜂毒液中到底存在哪些活性成分, 这些活性成分如何发挥作用, 仍然是值得探讨的问题。因此, 二化螟盘绒茧蜂毒液的活性成分组分及其作用机制将是值得探讨的重要课题内容之一。

第七章 不同地理种群二化螟相关免疫指标的测定

1 引言

二化螟是水稻上的主要害虫之一。二化螟在中国分布广泛,飞行能力不强,以滞育高龄幼虫当地越冬为主。近些年来,二化螟在我国水稻主产区的危害逐年加重(瞿开良,2007)。每年二化螟越冬幼虫的基数和越冬存活率决定了来年的发生程度,越冬二化螟能否安全越冬并成为有效虫源与其越冬生物学特性密切相关,同时也与水稻耕作栽培制度和全球气候变化等因素有关(沈建新等,2001)。二化螟在不同地区之间生态特点上展示明显的偏好性。即时在同一区域,二化螟的种群密度也会因为年份或季节的不同而不同。70年代,我国螟害轻微,但是在1993年,二化螟急剧回升,1996年以来更是连年爆发成灾,给水稻生产造成巨大损失(盛承发,2003)。如何有效、安全防治二化螟以促进水稻优质、高产、稳产是当前急需解决的重要课题之一。

昆虫免疫系统(包括细胞免疫和体液免疫)对于保证昆虫免受病原等侵扰、提高种群增长率具有重要意义。昆虫的免疫能力可受到外界环境的影响,从而引起寄主昆虫与寄生蜂之间的免疫竞争关系变化。鉴于昆虫血细胞数量和包囊能力等是检测细胞免疫水平的主要参数、酚氧化酶活性是衡量昆虫体液免疫水平的重要指标,本文拟通过系统研究这些二化螟免疫相关指标,比较二化螟种群免疫能力的地区差异,旨在为探讨螟虫防卫机理及其与寄生蜂优势种、病原生物流行等地区分布的关系,进而指导螟虫防治提供基础。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

二化螟:自浙江龙游,浙江金华,浙江富阳,湖北武汉,江苏高淳,江苏扬州,江西宜黄,浙江安吉水稻田采集越冬代二化螟幼虫,室内群体饲养,在人工

气候室($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L: 8D)内化蛹, 羽化后饲以 20% 蜜糖水, 在水稻苗上产卵, 收集卵块, 孵化后以稻种苗饲养(尚稚珍等, 1979), 取 5 龄二化螟幼虫用于实验(陆玉荣等, 2003)。

2.2 血细胞总数的测定

分别取浙江龙游, 浙江金华, 浙江富阳, 湖北武汉, 江苏高淳, 江苏扬州, 江西宜黄, 浙江安吉的单头 5 龄二化螟幼虫, 在无菌操作台内取单头二化螟幼虫血淋巴镜检。取血时, 在 Parafilm 膜上用灭菌后的眼科剪剪去幼虫的腹足, 待血淋巴自然流出吸取 $5\ \mu\text{L}$ 的血淋巴, 置入 Eppendorf 离心管中, 并加入 $10\ \mu\text{L}$ 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。在相差显微镜下 (200 x), 以血球计数板测定血细胞总数。每次测定 5 龄二化螟幼虫各 5 头, 并重复 3 次。

2.3 包囊反应的测定

分别取浙江龙游, 浙江金华, 浙江富阳, 湖北武汉, 江苏高淳, 江苏扬州, 江西宜黄, 浙江安吉的单头 5 龄二化螟幼虫, 将直径为 0.5mm 的钓鱼线插入二化螟体内, 室温下分别培养 6h, 12h, 24h 后取出, 利用 image j 软件进行计算灰度值计算。每次检查 5 龄化螟幼虫 5 头, 并重复 3 次。

2.4 PO 活性的测定

分别取浙江龙游, 浙江金华, 浙江富阳, 湖北武汉, 江苏高淳, 江苏扬州, 江西宜黄, 浙江安吉的单头 5 龄二化螟幼虫, 收集单头幼虫血淋巴放入冰浴的 Eppendorf 管内, 从中各取血 5 μL , 分别置于装有 90 μL 双蒸水的 Eppendorf 管内, 4°C , 8 000 r/min 离心 5 min, 将各管中的上清液分别取出, 4°C 下静置 1 h。另取 Eppendorf 管并加入以磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 6.8) 配置的 0.02 mol/L 的多巴胺溶液, 分别加入静置后的上清液 60 μL , 振荡混匀。室温下静置 5 min, 用酶标仪测定样品 OD 490, 并以多巴胺溶液作为对照。以每分钟内单位积样品 OD 值变化 0.001 为一个酶活单位 (u)。重复 3 次。血淋巴混合液蛋白总浓度测定

采用 Bradford(1976)检测法，用酶标仪测定样品 OD₅₉₅ 值，并以结晶牛血清白蛋白为标准蛋白，制作标准曲线。每次检查 5 龄化螟幼虫 3 头。

2.5 数据分析

数据采用 DPS 软件（唐启义和冯明光，2007）进行方差分析、*t* 测验等统计分析。采用对应分析（Correspondence Analysis）系统分析不同二化螟种群在免疫能力上的地区分布特征。

3 结果与分析

3.1 二化螟不同种群血细胞总数的测定

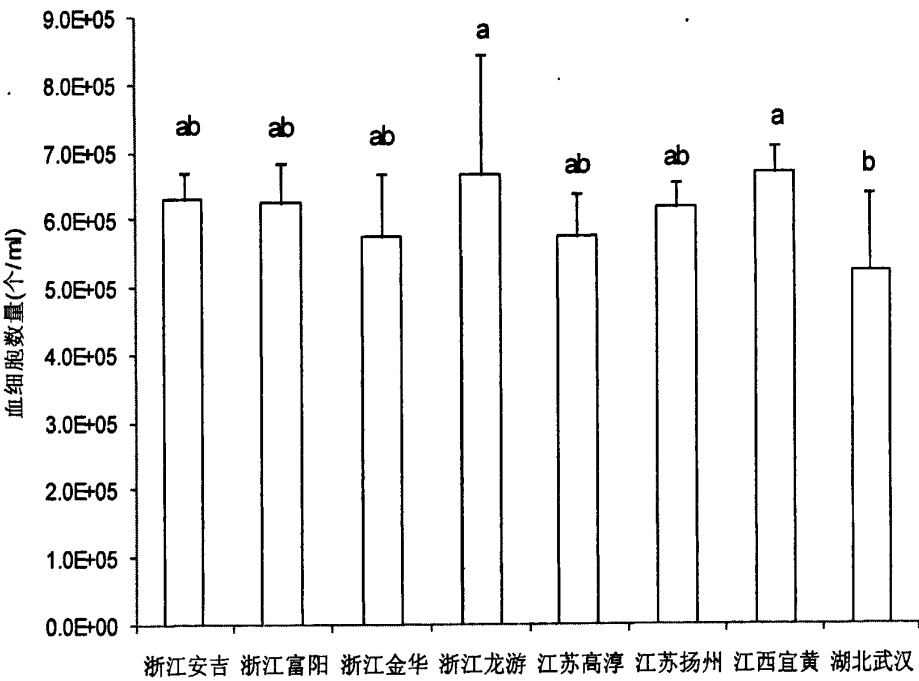


图 7.1 不同地区的血细胞总数

Figure 7.1 The THC of *Chilo suppressalis* larvae among different areas

由图 7.1 可以看出，不同地里种群之间血细胞数量存在一定差异。浙江龙游，安吉，金华，富阳，江苏高淳，扬州和江西宜黄之间不存在显著性差异，武汉与其他地区存在差异。

3.2 包囊反应的测定

在处理 6h 时，二化螟不同种群幼虫对鱼线包囊黑化程度存在明显差异（图 7.2），其中以浙江富阳和江西宜黄等种群显著高于江苏高淳和扬州以及湖北武汉等种群；12h 时，二化螟幼虫对鱼线的包囊黑化程度均有增加，其中以浙江安吉种群变化较为明显，而不同种群间的差异变化不明显，仍以浙江富阳和江西宜黄等种群显著高于江苏高淳和湖北武汉等种群；24h 后，二化螟不同种群幼虫的包囊黑化程度均明显增强，且不同种群间差异不再显著，其中江苏高淳和扬州以及湖北武汉种群的增幅较大。

3.3 PO 活性的测定

由图 7.3 可以看出，二化螟不同种群的幼虫血淋巴酚氧化酶存在明显差异其中以浙江富阳和金华等种群显著高于浙江安吉、江苏高淳和扬州以及江西宜黄等种群。

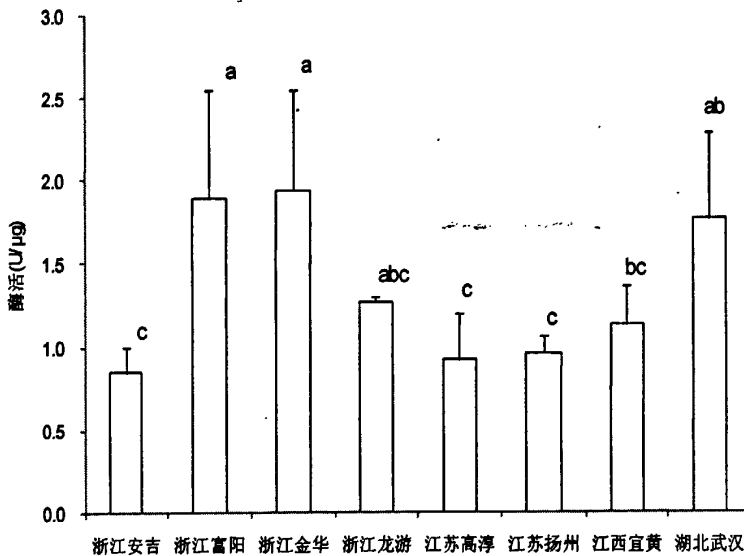


图 7.3 二化螟不同种群幼虫血淋巴酚氧化酶活性的比较

Figure 7.3 Comparison of phenoloxidase activity in larval hemolymph from different populations of *Chilo suppressalis*

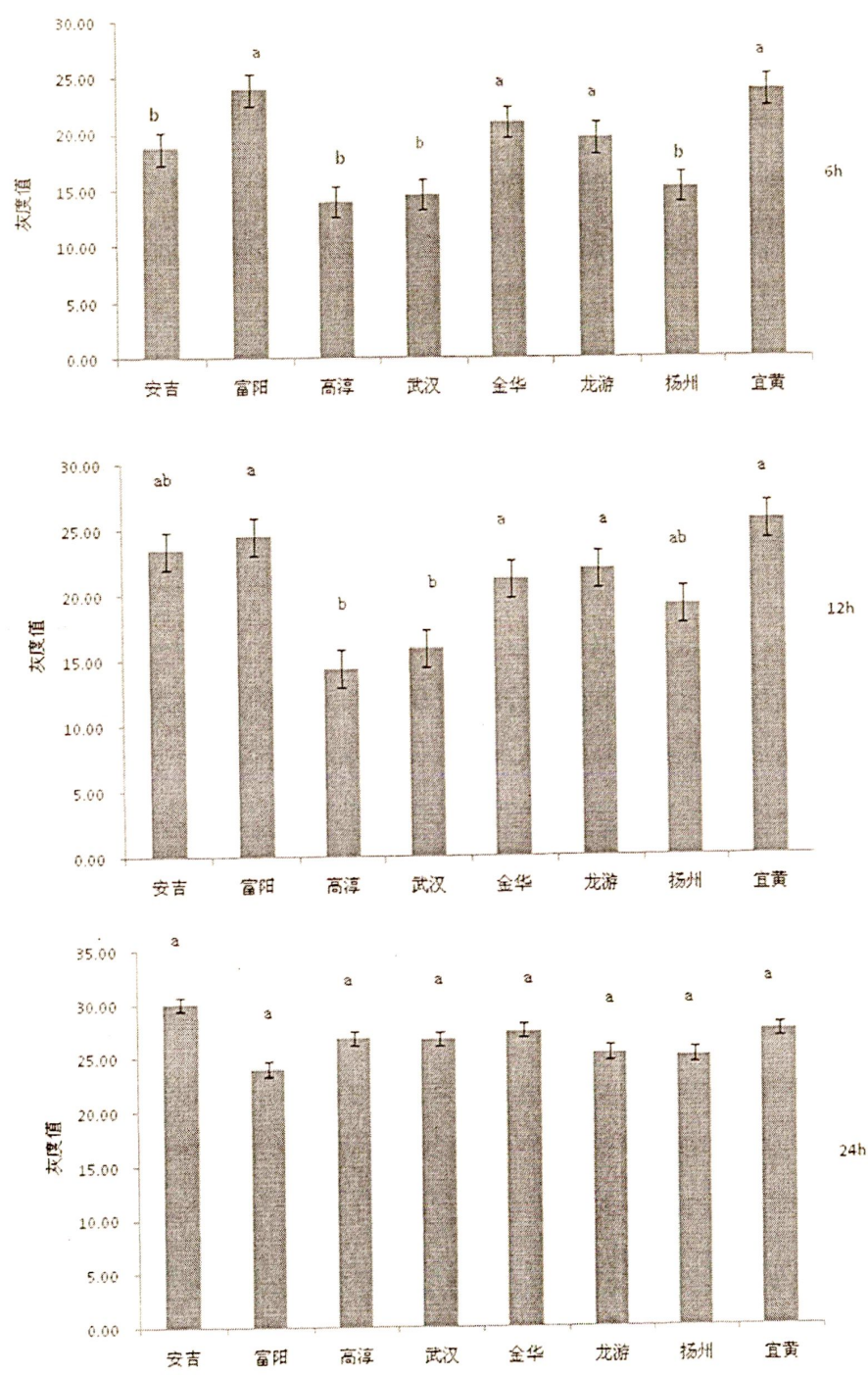


图 7.2 二化螟不同种群幼虫血细胞包囊能力的比较

Figure 7.2 Comparison of encapsulation capability of hemocytes in the larvae from different populations of *Chilo suppressalis*

3.4 二化螟不同种群血淋巴可溶性蛋白含量的比较

二化螟不同种群的幼虫血淋巴可溶性蛋白含量存在显著差异 (图 7.4), 其中

以湖北武汉种群显著高于浙江富阳和龙游等种群，而显著低于浙江安吉和金华、江苏高淳和扬州、以及江西宜黄等种群。

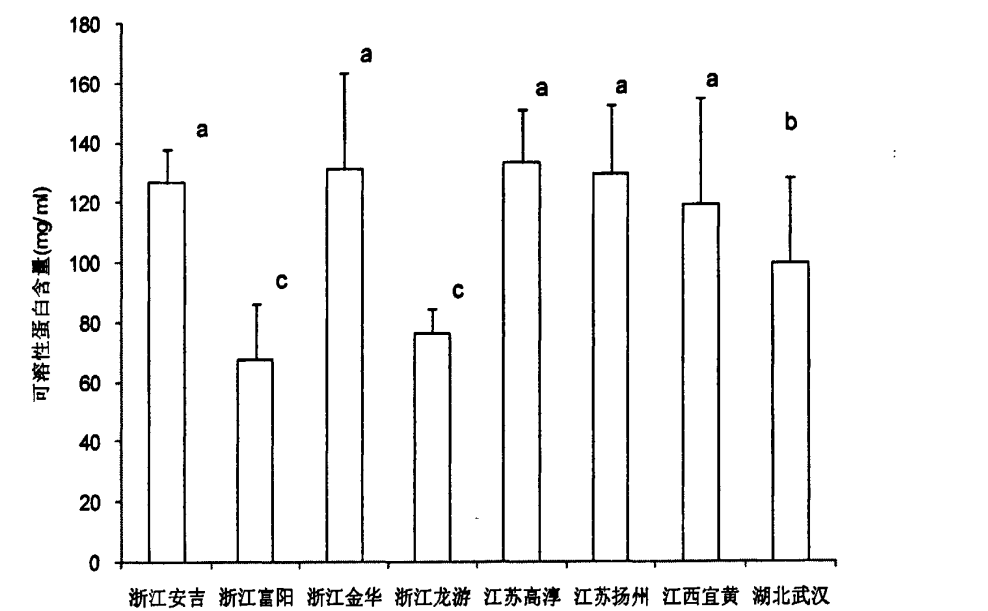


图 7.4 二化螟不同种群幼虫血淋巴可溶性蛋白含量的比较

Figure 7.4 Comparison of soluble protein content in larval hemolymph from different populations of *Chilo suppressalis*

3.5 二化螟不同种群免疫相关指标的对应分析

对二化螟不同种群免疫相关指标的对应分析发现，根据免疫能力相关指标可将不同地区二化螟盘绒茧蜂分成 4 个类群 ($X^2=94.9; df=35; p<0.001$): (1) 以浙北和苏南为代表的浙江安吉、江苏扬州和高淳种群; (2) 以浙西和赣中为代表的浙江富阳和龙游以及江西宜黄种群; (3) 以浙中盆地为代表的浙江金华种群; (4) 以华中地区为代表的湖北武汉种群。

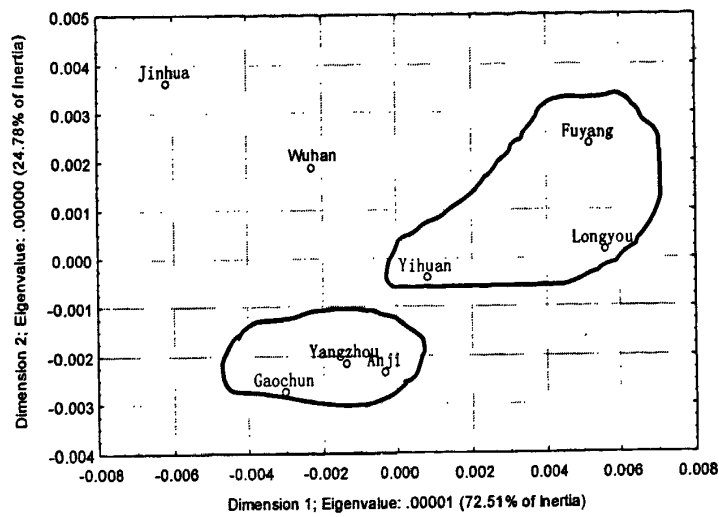


图 7.5 二化螟不同种群免疫相关指标的对应分析

Figure 7.5 Correspondence analysis of immune-associated parameters within different populations of *Chilo suppressalis*

4 讨论

鳞翅目幼虫的血细胞的生成与血腔中游离血细胞的细胞分裂及造血器官的造血功能有关 (Gardiner & Strand, 2000)。原血细胞是所有类型细胞分化的基础，这类细胞直接从造血器官中解离后游离于血腔中，再在其他生理因素的刺激下，进一步完成形态分化 (Gupa & Sutherland, 2000)。二化螟不同地区种群幼虫血细胞的数量差异可能与其体内造血功能以及原血细胞分化能力有关。

昆虫血细胞的包裹是颗粒血细胞和浆血细胞粘着于异物表面的囊鞘结构，其形成涉及血细胞接触异物后血细胞延展和粘附的性能改变，该过程受信号分子、粘附分子以及同源接受因子的调控 (Lavine & Strand, 2002)。二化螟不同地区种群幼虫在血细胞包裹能力上存在显著差异，这可能与颗粒血细胞和浆血细胞等在血细胞数量中所占比例及其延展性和粘附性等存在差异有关。

昆虫的体液免疫系统是昆虫免疫系统的重要促成部分，其中黑化过程是昆虫体内涉及免疫防御反应的重要生化过程，而酚氧化酶被认为在黑化过程中其关键作用 (Ratcliffe 等, 1984; Sugumaran & Kanost, 1993)。因此酚氧化酶活性是反映昆虫免疫防御能力的重要指标。二化螟不同地区种群幼虫在血淋巴酚氧化酶活性存在显著差异，这在一定程度上反映二化螟幼虫血淋巴黑化作用的强弱。

二化螟不同种群在免疫能力上的地区性差异,可能与当地种群的遗传结构及其生存环境有关。探明二化螟免疫能力的种群差异将有助于了解螟虫的防卫机理及其与寄生蜂优势种、病原生物流行等地区分布的关系。

第八章 总讨论

一 讨论

近年来,寄生蜂与寄主相互关系的研究应经成为国际上生物防治领域中的研究热点,并且主要是关于寄生蜂作用于寄主的生理、生化及分子机制的研究(Cai等, 2004; Hu等, 2003; Parkinson等, 2002; Rivers, 2004; Rivers等, 2002; Villagra等, 2002; Zhang等, 2004)。二化螟作为重要的水稻害虫,对其进行防治具有重要的经济效益和社会效益。而二化螟盘绒茧蜂作为二化螟幼虫重要的优势种天敌寄生蜂,其对二化螟具有很好的控害作用。因此,本文就此寄生蜂与其寄主二化螟之间的相互关系展开研究与讨论。

寄生蜂对寄主生理调控因子主要有 PDV、毒液、类病毒颗粒、卵巢蛋白、畸形细胞及寄生蜂幼虫分泌物等(Beckage & Gelman, 2004; Asgari & Schmidt, 1994; Beckage, 1998; Hochuli等, 1999; Jones, 1996; Kinuthia等, 1999; Luckhart & Webb, 1996; Rivers等, 2002; Shelby & Webb, 1999; Vinson等, 1998; 叶恭银 & 胡萃, 1998; 尹丽红, 2001),其中,研究的最多的是关于 PDV、毒液和畸形细胞的。研究认为在寄生蜂产卵后,毒液和 PDV 首先发挥作用来保护蜂卵,当寄生蜂孵化后,它们在畸形细胞和幼虫分泌蛋白的协同作用下,共同调节寄主的免疫系统。本论文通过对二化螟盘绒茧蜂的主要寄生因子展开研究,我们发现该蜂雌蜂中的主要寄生因子有 PDV、毒液和畸形细胞。

免疫抑制是保证寄生蜂成功寄生并完成生长发育的关键和前提条件,主要针对寄主的细胞免疫和体液免疫。被寄生蜂寄生后,寄主血细胞会通常发生一系列变化,例如血细胞数量及各类血细胞所占比例、细胞延展能力和包囊能力等发生改变等。这些变化往往会导致寄主血细胞的正常免疫反应受到阻碍,从而使得寄生蜂能够在寄主体内存活并且生长发育。本文研究发现,二化螟幼虫被二化螟盘绒茧蜂寄生后,血细胞总数、颗粒血细胞和浆血细胞数量均呈增多趋势,但是颗粒血细胞和浆血细胞所占血细胞总数的比例并未受到显著性影响。二化螟盘绒茧

蜂寄生对二化螟血细胞的死亡率存在明显影响。寄生后的二化螟血细胞死亡率多明显高于同期未寄生幼虫的，其中以寄生后第 1~4d 的死亡率显著为高。二化螟幼虫血细胞吞噬能力在被二化螟盘绒茧蜂寄生后，呈现先下降后升高的趋势，而且寄生后的血细胞吞噬能力多明显低于同期未寄生的。在二化螟盘绒茧蜂寄生后的开始阶段，二化螟幼虫血细胞延展性受到显著抑制，但随后延展性呈回升趋势；同样在寄生后的二化螟幼虫血细胞包囊能力亦呈先降后升的趋势。由于血细胞延展功能与其包囊能力密切相关，因此当血细胞延展能力恢复时，其包囊能力也逐渐恢复。鉴于二化螟幼虫可能通过增加细胞数量来加强对二化螟盘绒茧蜂卵入侵的免疫防御；而二化螟盘绒茧蜂则通过杀死血细胞以降低其数量，以及早期抑制血细胞的延展性、包囊和吞噬作用等来应对寄主细胞对蜂卵的免疫反应。当蜂卵孵化成幼虫后，似已适应寄主血细胞的免疫防御体系，可能采取其他方式应对寄主的免疫防御作用，因而寄主血细胞的延展性、包囊和吞噬作用有一定恢复。我们随后以二化螟盘绒茧蜂主要寄生因子对二化螟幼虫活体注射后，亦发现寄主血细胞有相似变化。尽管有学者认为抑制寄主血细胞免疫反应不一定是寄生蜂存活的必要条件之一（Asgari 等，2002；Moreau 等，2003），而我们根据二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主血细胞的影响，推测该寄生蜂应对寄主细胞免疫的策略可能只是不同寄生因子分阶段协同作用的结果。

在昆虫免疫系统中，体液免疫是重要的防御机制之一。在昆虫体液免疫反应中，酚氧化酶活性是评价其免疫能力的重要指标。二化螟幼虫在被二化螟盘绒茧蜂寄生后初期，其体内血淋巴酚氧化酶活性亦出现先增高后降低的趋势；活体注射该蜂寄生因子后酚氧化酶活性出现相似变化。由于酚氧化酶参与血细胞吞噬作用和包囊黑化反应等，因此寄生后寄主血淋巴酚氧化酶活性增高可能是寄主自身应对外源蜂卵侵入刺激的一种本能免疫信号反馈机制作用的结果，但由于血细胞免疫功能遭到破坏，因而酚氧化酶参与的免疫防御通路可能发生变化，从而产生大量血细胞致毒物质，使得血细胞坏死。当然，上述推测尚有待于实验证实。

另外，我们通过显微注射实验发现，注射毒液、萼液及两者混合物后二化螟幼虫的免疫反应与对照相比也发生了一系列的变化。注射毒液对二化螟幼虫血腔中血细胞的总数几乎不产生显著性影响，而注射同等浓度的卵萼液和混合物则会对血细胞的数量产生显著性差异，此外，注射混合物的二化螟的血细胞的数量要高于注射卵萼液的血细胞数量，由此我们可以看出，毒液对卵萼液有增效作用。

注射毒液、萼液及两者混合物后二化螟幼虫的血细胞延展能力得到了明显的抑制。我们可以看出: (1) 毒液在作用的早期对二化螟的血细胞的延展有很明显的抑制作用, 但是随着时间的延长, 这种抑制作用虽然一直存在, 但是有减弱的趋势, 说明二化螟的血细胞的延展能力得到了恢复 (2) 萼液和混合物对血细胞的延展能力有更明显的抑制作用, 而且这种作用有一定的持久性, 同时混合物的抑制作用更强烈一些。而前人研究表明, 注射毒液后寄主血细胞的延展能力的恢复可能是由于毒液免疫抑制功能的丧失或者是血细胞免疫功能的恢复 (Stoltz & Guzo, 1986)。毒液、卵萼液和混合物都起到了抑制血细胞包囊能力的作用, 但是三者的作用强度依次为混合物、卵萼液、毒液。而注射毒液、卵萼液和混合物后二化螟幼虫的酚氧化酶活性是升高的。通过体外实验我们也发现, 二化螟盘绒茧蜂毒液、卵萼液和混合物加入到离体血细胞后血细胞的延展率降低, 血细胞的死亡率升高, 细胞的包囊能力有所下降, 萼液和混合物对血细胞有更明显的作用, 而且这种作用有一定的持久性, 同时混合物的作用更强烈一些, 由此我们推断毒液对卵萼液有增效作用。

二化螟盘绒茧蜂寄生寄主后, 二化螟生长立即加速, 在寄生前期, 二化螟体重显著增加, 但发育受阻, 发育历期延长, 由于二化螟盘绒茧蜂从寄主体内啮出后, 寄主二化螟幼虫不再取食, 因此, 从整个过程来看, 寄生后的二化螟幼虫的食物摄取要低于对照。而对于寄生蜂而言, 刚寄生后的寄生蜂由于有较为充分的养分支持, 因此开始寄生蜂的发育较快, 但后来空间和养料的限制使得寄生蜂的发育缓慢。

二化螟盘绒茧蜂的幼蜂分为3个龄期, 其中, 前2个龄期的幼虫在寄主的体内度过, 3龄幼虫从寄主体内啮出并结茧化蛹。前人研究表明, 茧蜂的幼虫分为3个龄期是茧蜂的一个显著特点 (O'Donnell, 1987; Shaw, 1991; Carignan, 1995)。二化螟盘绒茧蜂蛹初期呈幼虫状, 单眼和复眼都是有颜色的, 蛹发育到后期阶段, 呈裸蛹状, 伴随着蜂蛹的发育, 下颚, 胸腔, 腹部, 触角的颜色依次逐渐加深。这与棉大卷叶螟甲腹茧蜂 (Albert, 1994), 半壁弯尾姬蜂 (黄芳, 2008) 个体发育过程中的体表着色顺序是一致的。

综上, 二化螟盘绒茧蜂通过长期的进化适应, 已能够对寄主生理过程包括免疫防御和营养代谢等进行有效调控, 从而使寄生蜂免受寄主免疫反应的影响, 完成自身的个体发育。

二、本论文创新之处:

本文首次以二化螟-二化螟盘绒茧蜂为研究模式系统,从寄生蜂的个体形态发育、主要寄生因子、寄生蜂寄生和寄生因子离体及活体注射等对寄主血细胞免疫和体液免疫的影响等方面展开系统研究,获得的结果为深入研究寄主-寄生蜂系统的生理调控机制提供重要参考。

三、不足之处

1. 本文仅就二化螟盘绒茧蜂寄生和主要寄生因子对寄主二化螟幼虫细胞免疫和体液免疫产生影响的现象作了描述,由于时间等限制未对产生这些现象的内在机理展开研究;
2. 本文有关二化螟不同地区种群间免疫相关能力的比较,未能结合其对寄生蜂免疫防御能力是否存在差异的关系分析。

四、未来的研究方向

在本文研究结果基础上,可进一步探讨二化螟盘绒茧蜂 PDV 及其基因表达产物对寄主二化螟幼虫的生理功能;并对二化螟盘绒茧蜂毒液成分作深入分析,以明确其与 PDV 的内在关系及其在寄主生理调控中的作用。

参考文献

- 白素芬, 陈学新, 符文俊, 程家安, 何俊华, 2002. 菜蛾盘绒茧蜂畸形细胞发育及其超微结构形态结构. 浙江大学学报(农业与生物技术版). 28(6): 635-645.
- 程家安主编. 水稻害虫. 北京, 中国农业出版社, 1996. 1~18, 47~48.
- 丁才银, 卢业湘, 林芳, 张明贵, 2006. 临澧县水稻二化螟的演替及防治对策. 湖南农业科学, (4): 62—64.
- 杭三保, 黄东林, 吴达璋, 1989. 二化螟绒茧蜂对寄主二化螟幼虫取食量和生长发育的影响. 江苏农学院学报, 10(3): 33-36.
- 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(4): 427-432.
- 蒋明星, 祝增荣, 朱金良, 诸茂龙, 廖璇刚, 王正军, 程家安, 1999. 不同生境中水稻二化螟的自然寄生情况. 中国生物防治, 15(4): 145-149.
- 瞿开良, 张昌辉, 姚本玉, 吴明东, 雷振东, 2007. 辰溪县三代二化螟大发生原因及治理对策. 湖南农业科学, (2): 103~104.
- 李季生, 夏爱华, 高绘菊, 胡传英, 牟志美, 2006. 蝇蛆寄生对家蚕血细胞和酚氧化酶活性的影响. 蚕业科学, 32(2): 268-271.
- 酈卫弟, 黄芳, 陈亚锋, 陈学新, 2006. 颈双缘姬蜂毒液对寄主小菜蛾的免疫抑制作用. 昆虫学报, 49(2): 206—212
- 刘奎, 林建荣, 符悦冠, 彭正强, 金启安, 2008. 椰扁甲啮小蜂寄生对椰心叶甲蛹免疫反应的影响. 昆虫学报, 51(10): 1011-1016.
- 潘健, 余红, 陈学新, 何俊华, 2004. 寄生蜂毒液的研究概况, 中国生物防治. 20(3): 150-155.
- 秦启联, 王方海, 龚和, 1999. 畸形细胞在协调寄生蜂同其寄主相互关系的作用. 昆虫学报. 42(4): 431-438.
- 尚稚珍, 王银椒, 邹水华, 1979. 二化螟饲养方法的研究. 昆虫学报, 22(2): 164—167.

- 沈建新, 张惠琴, 张洪坤, 2001. 耕作制度变革与水稻二化螟发生的关系及相应对策. 湖北植保, (3): 21-23.
- 盛承发, 王红托, 盛世余, 高留德, 宣维健, 2003. 昆虫知识, 40 (4): 289~294.
- 王方海, 古德祥, 龚和, 1999. 寄生蜂畸形细胞的主要结构和功能. 昆虫知识, 36 (2): 113-117.
- 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.
- 张忠, 叶恭银, 王洪祥, 蔡峻, 胡萃, 2005. 蝶蛹金小蜂寄生对菜粉蝶和玉带凤蝶蛹血细胞数量和组成的影响. 植物保护学报, 32(2): 158 - 162
- Albert U, Wyler T, Pfister-Wilhelm R, Gruber A, Stettler P, Heiniger P, Kurt E, Schumperli D, Lanzrein B, 1994. Polydnavirus of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae) characterization, genome organization and time point of replication. J. Gen. Virol. 75: 3353-3363.
- Arthur A P, 1961. The cleptoparasitic habits and the immature stages of *Eurytoma pini* Bugbee (Hymenoptera: Chalcidae), a parasite of the European pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Schiff.) (Lepidoptera: Olethreutidae). Can. Entomol. 93: 655-660.
- Asgari S, 2006. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoid: their role in host-parasite interactions. Arch. Insect Biochem. Physiol. 61: 146-156.
- 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, Schmidt O, Theopold U, 1997. A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. J. Gen. Virol. 78, 3061-3070.
- Asgari S, Zhang G M, Schmidt O, 2003. Polydnavirus particle proteins with similarities to molecular chaperones, heat-shock protein 70 and calreticulin. J. Gen. Virol. 84, 1165-1171.
- Asgari S, Hellers M, Schmidt O, 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. J. Gen. Virol. 77 (10):

2653-2662

- Asgari S, Zhang G M, 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
- Bai S F, Cai D Z, Li X, Chen X X, 2009. Parasitic castration of *plutella xylostella* larvae induced by polydnviruses and venom of *Cotesia vestalis* and *Diadegma semiclausum*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 70: 30-43.
- Barratt, B I P, Sountherland M, 2001. Development of teratocytes associated with *Microctonus aethiopodis* Loan (Hymenoptera: Braconidae) in natural and novel host species. *J. Insect Physiol.* 47: 257-262.
- Beckage N E, 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses. *Parasitology* 116 (S), 57 - 64.
- Beckage N E, Gelman D B, 2004. Wasp parasitoid disruption of host development : implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu Rev Entomol.* 49 : 299-330.
- Beckage N E, Metcalf J S, Nesbit D J, Schleifer K W, Zetlan S R, Buron I D, 1990. Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnvirus. *Insect Biochem.* 20 (3): 285-294.
- Beckmann M, Haack K J, 2003. Insektizide für die Land-wirtschaft: Chemische Schädlingsbekämpfung [Insecticides for agriculture: chemical pest control]. *Chemie in Unsere Zeit* 37, 88-97.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A, 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76
- Borges A R, Santos P N, Furtado A F, Figueiredo R C B Q, 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius Prolixus* (HemiPtera: Reduviidae) . *Micron*, 39(4): 486-494
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analy Biochem.* 72: 248-254.
- 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.
- 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 papae* (Lepidoptera: Pieridae). *Entomologia Sinica*, 8(4): 335-342.
- Carignan. 1995. Developmental biology and morphology of *Peristenus digoneutis* Loan (Hymenoptera: Braconidae: Euphorinae). *Biol. Control* 5:553-560.
- Carlini C R, Grossi-de-Sà M F, 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bio insecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.
- Carton V, Janmaat A F, Ericsson J D, Myers J H, 2008. Avoidance of the host immune response by a generalist parasitoid, *Compsilura concinnata* Meigen. *Entomology* 3: 517-522.
- Carton Y A, Nappi A J, 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics*. 52:157-164.
- Carton Y, Nappi A J, 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* 13:218-227.
- Carton Y, Poirié M, Nappi A J, 2008. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science* 15, 67-87.
- Casida J E, Quistad C B, 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1-16.
- Choi J Y., Whitten M M A., Cho M Y, Lee K Y, Kim M S, Ratcliffe N A, Lee, B A, 2002. Calreticulin enriched as an early stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 335-343.
- Crozatier M, Ubeda J M, Vincent A, Meister M, 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue Collier. *P LoS Biol.* 2, e196.
- Cusson M, Lucarotti C, Stoltz D, Krell P, Doucet D, 1998. A polydnavirus from the spruce budworm parasitoid, *Tranosema rostrale* (Ichneumonidae). *J Invertebr Pathol.* 72: 50-56.
- 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 *Campoplex sonorensis* polydnavirus. J Insect Physiol. 33 (3): 143-153
- Davies D H, Vinson S B, 1986. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. J Insect Physiol. 32: 1003-1010.
- De B, Beckage N E, 1992. Characterization of a polydnavirus (PDVs) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). J Invertebr Pathol. 59: 315-327.
- Dong K, Zhang D, Dahlman D L, 1996. Down-regulation of juvenile hormone esterase and arylphorin production in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 32, 237-248.
- 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.
- Eliod-Erickson M, Mishra S, Schenneider D, 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. Curr Biol. 10: 781-784.
- Eslin P, Doury G, 2006. The fly *Drosophila subobscura*: a natural case of innate immunity deficiency. Dev. Comp. Immunol. 30: 977-983.
- Fathpour H, Dahlman D L, 1995. Polydnavirus of *Microplitis croceipes* prolongs the larval period and changes hemolymph protein content of the host, *Heliothis virescens*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 28: 33-48.
- Flanders S E, 1942. Oosorption and ovulation in relation to oviposition in the parasitic Hymenoptera. Ann. Entomol. Soc. Am. 35: 251-266.
- Gerling D, Orion T, 1973. The giant cells produced by *Telenomus remus*. J Invertebr Pathol., 21:164-171.
- Giglio A, Battistella S, Talarico F F, Brandmayr T Z, Giulianini P G, 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. Micron, 39: 552-558
- Gillespie J P, Kanost M R, 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol., 42: 611-643
- Grimmelikhuijzen C J P, Cazzamali G, Williamson M, Hauser F, 2007. The promise

- of insect genomics. *Pest Manag. Sci.* 63, 413-416.
- Gupta P, Ferkovich S M, 1998. Interaction of calyx fluid and venom from *Microplitis croceipes* (Braconidae) on developmental disruption of the natural host, *Heliocoverpa zea*, and two atypical hosts, *Galleria mellonella* and *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol.* 44: 713-719.
- Guzo D, Stoltz D B, 1987. Observation on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. *J. Insect Physiol.* 33(1) : 19-31
- Hagen K S, 1964. Developmental stages of parasites. In *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (ed. P. DeBach), Chapman & Hall, London.
- Hamm J J, Styer E L, Lewis W J, 1990. Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Invertebr Pathol.* 55: 357-374.
- Hartzer K L, Zhu K Y, Baker J E , 2005. Phenoloxidase in Larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Molecular Cloning of the Proenzyme cDNA and Enzyme Activity in Larvae Paralyzed and Parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59: 67-79
- Hernandez S, Lanz H, Rodriguez M H, Martinez P A, Tsutsumi V, 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J Med Entomol.* 36:426-434.
- 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, Weimer E T, Sakell R H, Schmidt M, 2005. Sequence and characterization of honeybee venom acid phosphatase. *J. Allergy Clin. Immun.* 115, S107.
- Hoffmann J A, Janeway C A, Natori S, 1994. Phylogenetic perspectives in immunity : the insect host defense. R G Landes Company , Austin , Texas .
- Hotta M ,Okuda T, Tanaka T, 2001. *Cotesia kariyai* teratocytes : growth and development . *J. Insect Physiol.* 47:31-41.
- 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.

- Huang F, Shi M, Chen X X, Ye G Y, He J H, 2009. External morphology and development of immature stages of *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae), an important endoparasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 02: 532-538.
- Johansson M W, 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 303-315
- Jones D, 1996. Biochemical interaction between Chelonin wasps and their Lepidopteran hosts: After a decade of research – the parasite is in control. 26, 981 - 996.
- Junnikkala E, 1985. Testis development in *Pieris brassicae* parasitized by *Apanteles glomeratus*. *Entomol Exp Appl.* 37: 283-288.
- Kadono O K, Sakurai H, Takeda S, Okuda T, 1995. Synchronous growth of a parasitoid, *Perilitus coccinellae*, and teratocytes with the development of the host *Coccinella septempunctata*. *Entomol Exp Appl.* 75:145-149.
- Kim M K, Sisson G, Stoltz D, 1996. Ichnovirus infection of an established gypsy moth cell line. *J. Gen. Virol.* 77, 2321-2328.
- Kim S R, Lee K S, Yoon H J, Park N S, Lee S M, Je Y H, Jin B R, Sohn H D, 2004. cDNA cloning, expression, and characterization of an arylphorin-like hexameric storage protein, AgeHex2, from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 61-72.
- King PE, Ratcliffe NA, Copland M J W, 1969. The structure of the egg membranes in *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae). *Proc. R. Soc. London* 44: 137-142.
- King PE, Richards JG, 1969. Oogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Proc. Ent. Soc. London A* 44: 143-157.
- 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, 1986. The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. *J. Insect Physiol.* 32 (4): 369-375
- Krell P J, Summers M D, Vinson S B, 1982. Virus with a Multipartite Superhelical DNA Genome from the Ichneumonid Parasitoid *Campoletis sonorensis*. *J. Virol.*

- 1982 September; 43(3): 859-870
- Krell P J, 1987. Replication of long virus-like particles in the reproductive tract of the ichneumonid wasp *Diadegma terebrans*. J. Gen. Virol. 68: 1477-1484.
- Labrosse C, Eslin P, Doury G, Drezen J M, Poirié M, 2005. Haemocyte changes in *D. melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. J Insect Physiol. 51: 161-170.
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M, 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. Dev. Biol. 230: 243-257.
- Lavine M D, Strand M R, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-1309.
- Lawrence P O, Baker F C, Tsai L W, Miller C A, Schooley DA, Geddes L G, 1990. JH III levels in larvae and pharate pupae of *Anastrepha suspense* (Diptera: Tephritidae) and in larvae of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus* (Hymenoptera: Braconidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 13: 53-62.
- Le Ralec A, 1995. Egg contents in relation to host-feeding in some parasitic Hymenoptera. Entomophaga 40: 87-93.
- Leluk J, Schmidt J, Jones D, 1989. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. Toxicon 27: 105-114.
- Lowenberger C, 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 219-229
- Luckhart S, Webb B A, 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. Dev. Com. Immunol. 20, 1 - 21.
- Luo K J, Pang Y, 2006. Spodoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. J. Insect Physiol. 52, 795-806.
- Marmaras V J, Lampropoulou M, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. Cellular Signalling, 21: 186-195
- Marris G C, Bell H A, Naylor J M, Edwards J P, 1999. The role of *Plimpha hypochondriaca* venom in the suppression of pupal *Noctuid* host immunity. Entomol Exp Appl. 93: 291-298.
- Meister, M., 2004. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. Curr. Opin. Immunol. 16, 10-15.

- Moreau S J M, 2003. Relationships between parasitoid Hymenoptera and the immune system of their hosts: The “active” and “passive” mechanisms redefined. *An. Soc. Ent. France* 39: 305-314.
- Moreau S J M, Eslin P, Giordanengo P, Doury G, 2003. Comparative study of the strategy evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Dev. Com. Immunol.* 27: 273-282.
- Moreau S J M, Guillot S, 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1209-1223.
- Moreau, S J M, Cherqui A, Dubois F, Doury G, Fourdrain Y, Bulet P, Sabatier L, Saarela J, Prévost G, Giordanengo P, 2004. Identification of an aspartylglucosaminidase- like protein in the venom of the parasitic wasp *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 485-492.
- Muta T, Iwanaga S, 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 41-47
- Nakhási H L, Pogue G P, Duncan R C, Joshi M, Atreya C D, Lee N S, Dwyer D M, 1998. Implication of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol. Today* 14, 157-160.
- Norton W N, Vinson S B, Stoltz DB, 1975. Nuclear secretory particles associated with calyx cells of the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis* (Cameron). *Cell and Tissue Research* 162: 195-208.
- O'Donnell, D J, 1987. Larval development and the determination of the number of instars in *aphid* parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). *Int. J. Ins. Morphol.* 12, 231-238
- Oerke E C, Dehne H W, 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* 23, 275-285.
- 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 M, 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. Mol. Biol.* 32, 1 769-1 773.

- Pennacchio F, Strand M R, 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 233-258.
- Quicke D L J, 1997. *Parasitic wasps*. London: Chapman & Hall.
- Quistad G B, Nguyen Q, Bernasconi P, Leisy D J, 1994. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 955-961
- Ratcliffe N A, Leonard C M, Rowley A F, 1984. Prophenoloxidase activation: nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science* 226: 557-559.
- Reed D A, Brown J J, 1998. Host/parasitoid interactions: critical timing of parasitoid-derived products. *J. Insect Physiol.* 44: 721-732.
- 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. Fecundity and development of ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* are dependent on host quality. *Entomol Exp Appl.* 76:15-24.
- 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.
- Rivers D B, Ruggiero L, Yoder J A, 1999. Venom from *Nasonia vitripennis*: a model for understanding the roles of venom during parasitism by ectoparasitoids. *Trends Entomol.* 2:1-17.
- Rizki T M, Rizki R M, 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev. Com. Immunol.* 16: 103-110.
- Russo J, Brehelin M, Carton Y, 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47: 167-172.
- Schlenke, T A, Morales J, Govind S, Clark A G, 2007. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 3, 1486-1501.
- Schlenger E I, Hall J C, 1960. The biology, behavior, and morphology of *Praon palitans* Muesebeck, an internal parasite of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata* Buckton. *Ann. Entomol. Soc. Am* 53: 44-60.
- Schmidt J O, Theopold U, Strand M, 2001. Innate immunity and its evasion and

- suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23, 344-351.
- Shaw, M.R. 1991. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). In "Handbooks for the Identification of British Insects", vol.7", R. Entomol. Soc. Lond.
- 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 an insect plasma protein, arylphorin. *J. Gen. Virol.* 75: 2285-2292.
- Shelby K S, Webb B A, 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *J. Insect Physiol.* 45, 507 - 514.
- Shelby KS, Webb BA., 1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 263-70.
- Sorrentino RP, Carton Y, Govind S, 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* 243: 65-80.
- Sroka P, Vinson S B, 1978. Phenoloxidase activity in the haemolymph of parasitized and unparasitized *Heliothis virescens*. *Insect Biochem.* 8: 399-402
- Stettler P, Trenczek T, Wyler T, Pfister-Wilhelm R, Lanzrein B, 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* 44, 817-831.
- Stoltz D B, 1990. Evidence for Chromosomal Transmission of Polydnavirus DNA. *J. Gen. Virol.* 71: 1051-1056.
- Stoltz D B, Vinson S B, 1979. Viruses and parasitism in insects. *Adv. Virus Res* 24:125-171.
- Stoltz D B, Cook D I, 1983. Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid hymenoptera. *Cell.Mmol. Life Sci.* 39(9): 1022-1024
- Stoltz D B, Guzo D, 1986. Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae. *J. Insect Physiol.* 32(4) : 377-388.
- Stoltz D, Makkay A, 2000. Co-replication of a reovirus and a polydnavirus in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter exiguae*. *Virology* 278: 266-275.

- Strand M R , Wong E A, 1991. The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includes*(Hymenoptera: Scelionidae) .In Vitro Cell. Devp.Bio.,21:361-367.
- Strand M R, Pech L L, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40, 31-56.
- Strand M R, Noda T, 1991. Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis deolitor*. J. Insect Physiol. 37(11) : 839-850
- Suderman R J, Pruijssers A J, Strand M R, 2008. Protein tyrosine phosphatase-H2 from a polydnvirus induces apoptosis of insect cells. J. Gen. Virol. 89, 1411-1420.
- Sugumaran M, Duggaraju R, Generozova F, Itoh S, 1999. Insect melanogenesis. II. inability of *Manduca* phenoloxidase to act on 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. Pigm. cell Res. 12: 118-125.
- Sugumaran M, Kanost M R, 1993. Regulation of insect hemolymph phenoloxidase. In: Beckage N E, Thompson S N, Federici B A (eds), Parasites and Pathogens of Insects, vol. 2. Academic Press, San Diego, C A, pp. 317-342.
- Suzuki M, Tanaka T, 2006. Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. J. Insect Physiol. 52, 602-613.
- Tanaka T, 1986. Effects of the calyx and venom fluids of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the fat body and hemolymph protein contents of its host *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). Appl Ent. Zool 21: 220-227.
- Tanaka T, Tagashira E, 1996. Regulation of testis growth of the host, *Pseudaletia separata* by the polydnvirus and venom of *Cotesia kariyai*. In: XX Int.Con. Ent. Firenze, Italy, 157.
- 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. Depression of thoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. J. Insect Physiol. 37: 139-144.
- Teramoto T, Tanaka T, 2004. Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. J. Insect Physiol. 50, 1103-1111.

- Theilmann D A, Summers M D, 1988. Identification and comparison of *Campoletis sonorensis* virus transcripts expressed from four genomic segments in the insect hosts *Campoletis sonorensis* and *Heliothis virescens*. *Virology*, 167 (2): 329-341
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S, 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, 46: 1129-1135.
- Vass E, Nappi A J, 2001. Fruit fly immunity. *Bioessays*. 51:529-535.
- 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, Iwantsch G F, 1980. Host regulation by insect parasitoids. *Q Rev Biol* 55:143-165.
- Vinson S B, Lewis W J, 1973 . Teratocytes: growth and numbers in the hemocoel of *Heliothis virescens* attacked by *Microplitis croceipes*. *J. Invertebr Pathol.*, 22:351-355.
- Vinson S B, Pennacchio F, Lanzrein B, 1998. Interaction between parasitoids and their hosts: an introduction and perspective. *J. Insect Physiol.* 44, 701 - 702.
- Vinson S B, 1971. Defense reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. *J. Invertebr Pathol.* 18: 94-100.
- Vinson S B. Development and possible functions of teratocytes in the host-parasite association. *J Invertebr Pathol.* 1970 ,16:93-101.
- Wago H, Tanaka T, 1989. Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the granular cells of *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Zool. Scr.* 6: 691-696.
- Webb B A, 1998. Polydnavirus biology: genome structure and evolution, in: A. Ball, L.K. Miller (Eds.), *The Insect Viruses*, Plenum Press, New York, pp. 105-139.
- Wertheim B, Kraaijeveld A R, Schuster E, Blanc E, Hopkins M, Pletcher S D, Strand M R, Partridge L, Godfray H C, 2005. Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. *Genome Biol.* 6, R94.
- Williams M J, Ando I, Hultmark D, 2005. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* 10, 813-823.

- Williams M J, Wiklund M L, Wikman S, Hultmark D, 2006. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J. Cell Science* 119, 2015-2024.
- Wyder S, Blank F, Lanzrein B, 2003. Fate of polydnavirus DNA of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* in the host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* 49: 491-500.
- Yokoo S, Goetz P, Toio S, 1995. Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Gazleria mellonella*. *Appl Entomol Zool.* 30:343-350.
- Yu R X, Chen Y F, Chen X X, Huang F, Lou Y G, Liu S S, 2007. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitoid wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. *J. Insect Physiol.* 53: 22-29.
- Zhang D, Dahlman D L, 1989. *Microplitis croceipes* teratocytes cause developmental arrest of *Heliothis virescens* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 12: 51-61
- Zhang G M, Schmidt O, Asgari S, 2006. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 756-764.
- Zhang, G M, Schmidt O, Asgari S, 2004. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 41580-41585.