短期高温对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂发育和繁殖的影响*

崔宝玉** 钱海涛 董 辉 丛 斌*** 李旭辉

（沈阳农业大学植物保护学院 害虫生物防治研究室 沈阳 110161）

Effect of high temperature shock on *Trichogramma dendrolimi* infected by *Wolbachia*. CUI Bao-Yu**, QIAN Hai-Tao, DONG Hui, CONG Bin***, LI Xu-Hui (*Laboratory for Bio-control of Pest Insects, College of Plant Protection, Shenyang Agriculture University*, Shenyang 110161, China)

Abstract *Trichogramma dendrolimi* Matsumura infected by *Wolbachia* has a character—thelytokous reproduction. However, high temperature may affect this character. To simulate this condition in field, a test single heat shocks (32, 35 and 38 ℃) for 6 hours was applied to middle stage and late stage of pupae of *T. dendrolimi* infected by *Wolbachia*. A series of data was recorded including the percentages of adult emergence rate, number of wasps per host egg, female ratio and longevity as well as the number of wasps with parasitization, percent emergence, number of wasps per host egg and female ratio in the next generation. The results showed the high temperature shocks had negative effect to both middle stage and late stage of pupae, especially at 38 ℃. At this temperature, emergence rate and number of wasps per host egg were remarkably reduced. The sensitive level between middle stage and late stage of pupae has no remarkable difference. For the progeny generation, all parameters as a whole seem to be little affected by the heat shock experienced in the parent generation. In the two generations wasps, there is no male emergence. This indicates that short high temperature shocks can not influence the action of *Wolbachia* manipulating reproduction of their hosts.

Key words *Trichogramma dendrolimi*, *Wolbachia*, heat shock, biological control

摘 要 感染了沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura 营孤雌产雌生殖方式，但高温可能影响这一特性。为了模拟该赤眼蜂在田间遇到短期高温后的受影响情况，研究了柞蚕卵繁殖的 *Wolbachia* 感染了 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂孤雌产雌品系，于蛹中期和蛹后期经历 6 h 32, 35, 38 ℃高温单次冲击处理，对当代羽化出蜂率、单卵出蜂数、单卵雌蜂率、寿命 4 个指标和处理子代羽化出蜂率、有效繁殖个体、单卵出蜂数、单卵雌蜂率 4 个指标的影响。结果表明，短期高温刺激会对孤雌产雌的松毛虫赤眼蜂产生不利影响，尤其是 38 ℃高温不利影响明显，主要表现在羽化出蜂率和单卵出蜂数两指标明显降低；高温冲击对子代蜂各指标影响不明显。2 代赤眼蜂均未有雄峰出现，表明短期高温冲击不能对 *Wolbachia* 调控其宿主生殖方式的作用产生影响。

关键词 松毛虫赤眼蜂，沃尔巴克氏体，高温冲击，生物防治

赤眼蜂是世界范围内害虫生物防治中研究最多、应用最广的一类卵寄生蜂[1]，其中松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura 是目前在我国研究与利用最为深入，应用范围最为广泛的一种赤眼蜂[2]。

沃尔巴克氏体（*Wolbachia*）是一类广泛分布于节肢动物生殖组织内的共生细菌。全世界有多种昆虫感染有 *Wolbachia* 体，其中包括近 20 种赤眼蜂，该菌可通过卵的细胞质传播并参与多种调控其宿主生殖活动的机制，如诱导细胞质不亲和、诱导孤雌生殖、诱导雌性化等[3~7]。赤眼蜂孤雌生殖的原因多数是因为感染了能诱导其孤雌生殖的共生菌——*Wolbachia* 体[8,9]。垂直传递是 *Wolbachia* 在宿主体内的基本传递模式，但有试验证明该菌在宿主间也存在水平传播[10,11]。本实验室水平转染了诱导孤雌产雌的 *Wolbachia* 于松毛虫赤眼蜂体内，成功获得了孤雌产雌松毛虫赤眼蜂品系，经室内数代繁殖

* 国家自然科学基金项目（30170625）；国家“十五”科技公关项目（2001BA509130401）。

** E-mail：baoyu1019@sina.com

*** 通讯作者，E-mail：bin1956@163.com

收稿日期：2006-09-20，修回日期：2006-12-06，

接受日期：2007-03-08

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

生殖方式稳定[12]。赤眼蜂通过雌蜂产卵于寄主卵内而杀死害虫，所以全部为雌蜂的孤雌产雌赤眼蜂品系应用于生物防治中比两性生殖的赤眼蜂品系更具优势。

Stouthamer 等研究表明 30℃以上高温持续处理可使赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 活性受到抑制而使其恢复两性生殖方式[13]。而松毛虫赤眼蜂在实际应用中，一般是将寄生柞蚕卵蜂卡暴露于田间，经历一定环境积温羽化出蜂后寻找害虫卵寄生，从而达到控制害虫的目的。此间难免遭遇高温天气的影响，特别是夏季一些地区日最高温度可达近 40℃，并持续几小时，这样的高温对释放的赤眼蜂的影响在我国报道很少，尤其是这种短期高温对感染了 *Wolbachia* 的孤雌产雌松毛虫赤眼蜂品系的影响，是否会使该品系特殊的生殖方式改变更未见报道。作者在这方面开展初步研究，以期为感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂孤雌产雌品系在我国生物防治中的应用前景提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蜂种为孤雌产雌的松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura 品系。该品系由本实验室成功转染诱导 *Wolbachia* 孤雌产雌品系得到[12]，经数代繁殖该蜂生殖方式稳定。试验开始前 3 代，用新鲜柞蚕蛾剖腹卵在(26±1)℃、RH 75%~80%，光照 16 h/d 条件下繁育，接蜂时间为 24 h。

试验当日收集新鲜柞蚕蛾剖腹卵作为寄主卵。

1.2 方法

1.2.1 处理设置：设(32±1)℃、(35±1)℃、(38±1)℃ 3 个高温处理，处理时间均为 6 h，对照温度为(26±1)℃，设置蛹中期和蛹后期 2 个高温处理虫期，分别在(26±1)℃条件下接蜂 24 h。以接蜂完毕为起点发育 165 h(蛹中期)和 215 h(蛹后期)。预备试验得出，试验蜂种以接蜂完毕为起点发育至开始羽化共需约 234 h。发育 165 h 时，卵内大部分赤眼蜂体表乳白，复眼和单眼呈鲜红色，头胸腹分界明显，足翅触角皱缩，未伸展；发育 215 h 时，复眼深红色，翅足渐与躯体分离，体黄褐，卵内个别个体羽化。两因素互相组合共 6 个处理，以未经高温处理的赤眼蜂作各个处理的对照，试验中 RH 70%~80%。

1.2.2 测试方法：将新鲜柞蚕卵平铺于昆虫标本盒(25 cm×20 cm×5.5 cm)内底部，把已开始羽化的种蜂寄生卵按盒内柞蚕卵量的 1∶20 均匀放在盒内，在(26±1)℃、RH 75%~80%、黑暗条件下接蜂 24 h 后除尽成蜂和种蜂寄生卵。待寄生卵发育变成灰色后，把卵粘在纸卡上，每卡约 110 粒寄生卵放入大指形管中，每处理 5 管，待其羽化出蜂后，调查羽化出蜂率(以具羽化孔的寄生卵数量和寄生卵数量百分比估计)。同时每处理及对照分别选取 20 粒卵，单粒分装于 5 cm×1 cm 的小指形管内，待其羽化出蜂完成后调查统计单卵羽化出蜂数和雌蜂率。

当赤眼蜂羽化后，每处理选取 40 头雌蜂，单蜂引入小指形管，其中 20 头每头提供 1 粒柞蚕卵供其寄生，待寄生卵羽化后，调查统计有效繁殖个体蜂数(寄主卵变灰及解剖可见蜂蛹的个体数)、羽化出蜂率、单卵羽化出蜂数和雌蜂率；20 头不提供柞蚕卵，每隔 12 h 统计其寿命，按 0.5 d 间隔计。

待所有处理出蜂完毕后解剖被寄生的卵，统计查看卵内残留成蜂中雄蜂数量。避免遗漏未羽化出卵的雄性成蜂。

1.3 数据分析

实验数据用 DPS v3.01 软件进行数据处理，差异显著性用 Duncan 新复极差法分析。

2 结果与分析

2.1 高温冲击对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂当代的影响

2.1.1 羽化出蜂率和单卵羽化出蜂数。试验结果见表 1。孤雌产雌品系松毛虫赤眼蜂在 26℃下发育(对照组)，羽化出蜂率为 87.64%。与对照相比，在蛹中期经高温处理后，32℃和 38℃下的羽化出蜂率都有显著影响，而蛹后期

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

经历高温冲击后只有 38 ℃下羽化出蜂率受影响显著。由单粒被寄生的柞蚕卵的单卵出蜂数可看出，只有 38 ℃条件下的单卵出蜂数受到显著影响，其余处理均与对照差异不显著。相同温度条件下，蛹中期和蛹后期 2 个虫态之间差异均不显著。以上结果表明，柞蚕卵繁殖的孤雌产雌品系松毛虫赤眼蜂不同虫态对高温的敏感程度是没有显著差异的，温度是影响其生长发育各项指标的主要环境条件。尤其是 38 ℃条件下短期高温会对赤眼蜂的羽化出蜂情况和繁殖量造成负面影响。

2.1.2 单卵雌蜂率：由单粒被寄生柞蚕卵羽化出蜂的赤眼蜂均为雌蜂，未有雄峰出现，即单卵雌蜂率均为 1（表 1）。这表明短期的高温刺激不会使当代孤雌产雌品系的松毛虫赤眼蜂改变生殖方式，也就是短期的高温刺激未对 *Wolbachia* 调控其宿主生殖方式的作用产生明显影响。

2.1.3 寿命：各处理经高温冲击后的寿命与对照均没有显著差异，表明高温冲击对寿命无显著影响（表 1）。

表 1 不同高温和虫期组合下对孤雌产雌品系松毛虫赤眼蜂当代蜂发育和繁殖的影响

温度(℃)	虫态	羽化出蜂率(%)	单卵出蜂数(头)	单卵雌蜂率(%)	寿命(d)
26	蛹中、后期	87.64±0.02a(5)	74.95±1.87a(20)	100	1.25±0.38ab(20)
32	蛹中期	74.70±0.04bc(5)	46.7±2.18ab(20)	100	1.125±0.27b(20)
	蛹后期	77.18±0.02abc(5)	51.15±2.02ab(20)	100	1.125±0.42b(20)
35	蛹中期	84.71±0.02ab(5)	65.35±2.02ab(20)	100	1.10±0.38b(20)
	蛹后期	81.97±0.10ab(5)	47.20±2.32ab(20)	100	1.125±0.31b(20)
38	蛹中期	71.84±0.07bc(5)	33.85±2.19b(20)	100	1.00±0.28b(20)
	蛹后期	65.42±0.11c(5)	35.05±2.20b(20)	100	1.45±0.39a(20)

注：表中数值均为平均值±标准误；表中同列数字后字母为新复极差比较的结果，有相同字母表示差异不显著，字母不同表示差异显著，下同；括号内数据为观察次数。

2.2 高温冲击对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂子代的影响

由表 2 可知，不同处理的单卵出蜂数与对照均没有显著差异，但数值较低，由此估计高温刺激没能对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂繁殖和羽化造成大的负面影响。由表 2 还可看出，有效繁殖个体随温度的升高而减少。在观察过程中没有雄蜂出现，单卵雌蜂率仍均为 1。总体看来，高温处理对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂子代繁殖力影响不显著，且此种赤眼蜂的生殖方式没有改变，可见，短期高温刺激不能使松毛虫赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 失去调控其宿主生殖方式的能力改变。

2.3 残留统计

解剖寄生卵统计其中残留的雄性成蜂个数的过程中，未发现有雄性成蜂。

3 讨论

温度是影响赤眼蜂发育的重要生态因子。有研究证明温度 24 ~ 28 ℃为繁殖感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂的理想温度条件[14]。但是赤眼蜂防治害虫应用于夏季，在田间肯定会经历高温冲击。已有多位学者研究过短期高温冲击对赤眼蜂生长发育和繁殖的影响[15~17]，但关于感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂经历短期高温冲击后的反应的研究还很少。

由于 30 ℃以上持续高温处理（高温条件下饲养）可使赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 活性受到抑制而使其恢复两性生殖方式[13]，所以把这种孤雌产雌品系的赤眼蜂应用于田间首要考虑的问题是日间的短期高温冲击是否会和持续高温一样对 *Wolbachia* 调控其宿主生殖方式的活性产生影响而使其改变生殖方式。本研究结果表明，2 代赤眼蜂均为雌性，未见雄蜂，所以短期的高温冲击不会对感染 *Wolbachia* 的孤雌产雌品系松毛虫赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 活性产生抑制作用而使其恢复为两性生殖。这可能是由

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

于长期持续的高温积累会完全抑制 *Wolbachia* 的活性而其宿主恢复为正常的生殖型;本试验中短期的高温刺激(6 h 左右)不足以使 *Wolbachia* 在宿主体内的活动受到抑制,仍然能够保持其作用活性,诱导其宿主营孤雌产雌。可见高温持续的时间长短对 *Wolbachia* 作用活性的影响程度是不一样的。试验过程中解剖统计卵内残留蜂性别时,也未见雄性成蜂,卵内残留个体多数处于非成虫虫态,性征不明显,不能准确判定性别,故结果可能有误差。

表 2　不同高温和虫期组合下对孤雌产雌品系松毛虫赤眼蜂子代蜂发育和繁殖的影响

温度(℃)	虫态	观察次数	有效繁殖个体(头)	羽化出蜂率(%)	单卵出蜂数(头)	单卵雌蜂率(%)
26	蛹中、后期	20	15	60.00	50.13±2.25a	100
32	蛹中期	20	12	50.00	42.83±2.33a	100
	蛹后期	20	10	50.00	33.80±2.22a	100
35	蛹中期	20	10	40.00	32.40±2.27a	100
	蛹后期	20	9	44.44	38.22±2.35a	100
38	蛹中期	20	9	44.44	37.33±2.33a	100
	蛹后期	20	7	57.14	44.57±2.33a	100

柞蚕卵粒大,具有较高的繁蜂效率,价格低廉,便于储运,是我国赤眼蜂商品化生产中最重要的人工繁蜂中间寄主[18]。感染 *Wolbachia* 的孤雌产雌松毛虫赤眼蜂对柞蚕卵有较高的选择性[19],柞蚕卵可用于大量繁殖该品系松毛虫赤眼蜂。本研究结果表明,在柞蚕卵中发育的感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂处于蛹中期和蛹后期会受高温冲击影响,尤其是 38 ℃的高温影响显著,表现为羽化出蜂率和单卵羽化出蜂数与对照相比差异显著。但高温冲击对子代蜂未表现出明显的不利影响。这与耿金虎等[20]对两性松毛虫赤眼蜂做高温冲击试验的结果一致。

感染 *Wolbachia* 的孤雌产雌松毛虫赤眼蜂要应用于生产实践,首先要在室内做初步试验得出其适合释放虫态和环境条件。本研究得出,蛹中期和蛹后期对温度的敏感程度是没有明显差异的,所以应用这 2 种虫态于田间均可。另外,结合当地的气候条件,避免 38 ℃时高温放蜂,可减小赤眼蜂受不利气候条件的影响程度。夏日高温可能持续多日,因而应该对该蜂在累积逐日短期高温冲击下的特性做进一步研究。本研究为感染 *Wolbachia* 的孤雌产雌松毛虫赤眼蜂将来的应用实践提供了理论和实验基础。

参 考 文 献

1 Li L. Y. In: Wajnberg E., Hassan S. A. (eds.), Biological Control with Egg Parasitoids. England: CAB Intl., 1994. 37~53.
2 张荆,王金玲,杨长成,丛斌. 沈阳农业大学学报,1994,**25**(3):254~258.
3 Breeuwer J. A. J., Werren J. H. *Nature*, 1990, **346**: 558~560.
4 Vavre F., Girin C., Bouletreau M. *Inesect Mol. Biol.*, 1999, **8**(1): 67~72.
5 Dyson E. A. M., Kamath M. K., Hust G. D. *Heredity*, 2002, **88**(3): 166~171.
6 龚鹏,沈佐锐,李志红. 昆虫学报,2002,**45**(2):241~252.
7 钟敏,沈佐锐. 昆虫学报,2004,**47**(6):732~737.
8 Stouthamer R. *Entomophaga*, 1993, **38**: 3~6.
9 丛斌,Stouthamer R.,Schilthuizen R. 见:程登发主编,植物保护21世纪展望. 北京:中国科学技术出版社,1998. 665~669.
10 Huigens M. E., Luck R. F., Klaassen R. H. G., Maas M. F. P. M., Timmermans M. J. T. N., *et al*. *Nature*, 2000, **405**: 178~179.
11 Werren J. H., Zhang W., Guo L. R. *Proc. R. Soc. London*, 1995, **261**: 55~63.
12 王翠敏. 硕士学位论文. 沈阳:沈阳农业大学. 2005.
13 Stouthamer R., Luck R. F, Hamilton W. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**: 2424~2427.
14 张海燕,丛斌,田秋,付海滨,董辉. 昆虫学报,2006,**49**(3):433~437.
15 Chihrane J., Laug G., Hawlitzky N. *Entomophaga*, 1993, **38**(2): 185~192.
16 Chihrane J., Laug G. *Biological Control*., 1996, **7**: 95~99.
17 Ramesh B., Baskaran P. *Entomophaga*, 1996, **41**(2): 267~277.
18 万方浩,叶正楚,郭建英,谢明. 昆虫知识,2000,**37**(2):65~74.
19 付海滨,丛斌. 中国生物防治,2005,**21**(增刊):83~85.
20 耿金虎,沈佐锐,李正西,张帆. 中国生物防治,2005,**21**(4):222~226.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n