

高温和四环素对 *Wolbachia* 诱导孤雌产雌短管赤眼蜂的影响*

潘雪红^{1,2} 何余容^{1* *}

1. 华南农业大学昆虫生态研究室, 广州 510642; 2. 广西壮族自治区甘蔗研究所, 南宁 530007

摘要 采用持续高温(30 ℃和33 ℃恒温)饲养生长24 h后的短管赤眼蜂和不同质量浓度四环素(四环素+30%的蜂蜜水配成)喂养成虫的方法,观察各处理对孤雌产雌短管赤眼蜂(*Trichogramma pretiosum* Riley)性别和产卵量的影响。结果表明:高温处理后,短管赤眼蜂由原来的完全孤雌产雌变成了完全孤雌产雄,并只出现少量雌雄嵌合体(数量不到1%),其产卵量也比未处理的显著降低,说明高温能将短管赤眼蜂体内的沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)完全并快速杀死;用1、10、100 mg/mL 3个质量浓度的四环素对完全产雌孤雌生殖的短管赤眼蜂连续处理8代后,每代均出现少量的雄蜂和雌雄嵌合体,且随着处理代数的增加,短管赤眼蜂平均产卵量开始有下降的趋势,在F₂代达到最低,随后又呈上升趋势,在F₇和F₈代平均产卵量甚至高于F₁代,各处理代产卵量较不处理代F₀均显著降低。

关键词 短管赤眼蜂; 高温; 四环素; 沃尔巴克氏体; 生殖力

中图分类号 S 476⁺.3; S 477⁺.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0687-05

赤眼蜂作为卵寄生蜂,是现代农林害虫生物防治上研究历史最久、应用范围最广、防治面积最大、治虫效果最好的一类重要天敌^[1]。赤眼蜂主要营两性生殖,受精的双倍体卵发育为雌性后代,而未受精的单倍体卵发育为雄性后代。然而在自然界,经常能发现一些赤眼蜂种类的完全或部分产雌孤雌生殖现象,研究结果证实这一现象是由内生细菌沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)引起的。目前,至少在21种产雌孤雌生殖的赤眼蜂中检测到*Wolbachia*^[2]。

Wolbachia 属于 Proteobacteria 的 α 亚门,是一种立克次氏体,它们通过共生诱导赤眼蜂产雌孤雌生殖^[3-10]。然而,利用高温或四环素处理可以使*Wolbachia*失活。Pintureau等^[11]利用100 mg/mL四环素对含有*Wolbachia*并完全产雌孤雌生殖的科尔多瓦赤眼蜂(*Trichogramma cordubensis*)进行循环处理,可使雄蜂与雌雄嵌合体的总比率不断增加,但停止处理后不久赤眼蜂将恢复孤雌产雌而不能得到永久的*Wolbachia*治愈品系。Grenier等^[12]通过添加0.02%的四环素到赤眼蜂人工卵液中,仅仅经过1次处理就有效地消除了赤眼蜂体内的*Wolbachia*,并且通过*wsp*基因的PCR检测手段,从治

愈后直到14代都没有检测到*Wolbachia*的存在,从而获得了稳定的两性生殖品系。

短管赤眼蜂(*Trichogramma pretiosum* Riley)是一个感染*Wolbachia*后完全产雌孤雌生殖的纯化品系^[3]。笔者通过3个不同质量浓度梯度四环素和2个温度梯度对短管赤眼蜂成蜂进行持续多代处理,然后对处理过的后代短管赤眼蜂的生殖力、正常和不正常雌雄蜂(雌雄嵌合体)出现的比率进行比较分析,探讨了*Wolbachia*在短管赤眼蜂中的稳定性,观察了高温和四环素在灭活*Wolbachia*的同时对短管赤眼蜂繁殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试蜂种与寄主

供试蜂种:短管赤眼蜂(*T. pretiosum*)是从法国引进的含*Wolbachia*的完全孤雌产雌品系,在华南农业大学昆虫生态室养虫室(室温25 ℃左右,相对湿度70%~80%,光照条件16L/8D)用米蛾卵繁殖保种,室温条件下其世代历期约为11 d。供试寄主:在室内用面粉饲养米蛾(*Corcyra cephalonica* Stainton),以新鲜米蛾卵作为赤眼蜂的寄主。

收稿日期:2010-03-17; 修回日期:2010-04-26

* 国家自然科学基金项目(30370966)、广西农业科学院基金项目(2007006)和广西甘蔗研究所基本科研业务专项(G2009009)资助

* * 通讯作者。E-mail: yrhe@scau.edu.cn

潘雪红,女,1979年生,硕士,助理研究员。研究方向:害虫生物防治。E-mail: panxuehong218@163.com

1.2 高温处理

试验设置(33±1)℃和(30±1)℃ 2个温度,并用人工气候箱(广东韶关科力仪器厂,PYX-300Q-B)控制温度。气候箱的相对湿度为60%~70%。

将大量的短管赤眼蜂引入放有米蛾卵卡的大试管(直径4 cm,长10 cm)内,在25℃条件下寄生约24 h后将蜂赶出,放置卵卡于相应温度的培养箱中进行培养,直至出蜂取出(约7 d)。短管赤眼蜂出蜂后随机挑取30头雌蜂,单蜂引入小试管(直径1 cm,长5 cm)中,喂以30%蜂蜜水并放入米蛾卵卡,置于常温(25℃)下,让其子代发育至成蜂。同时将管中其余的短管赤眼蜂引入另一试管中,放入米蛾卵卡,让其在25℃条件下寄生24 h后,放入相应的培养箱重复进行高温处理。连续处理几代,直至短管赤眼蜂后代中全部出现雄蜂为止。

1.3 四环素处理

以四环素+30%蜂蜜水配成1、10、100 mg/mL 3种质量浓度的四环素蜂蜜水。短管赤眼蜂出蜂后,在大试管管壁均匀地涂上相应质量浓度的四环素蜂蜜水,并引入约100头短管赤眼蜂成蜂喂养24 h后,供以1张新鲜米蛾卵卡,让其寄生24 h后将蜂赶出,放置卵卡于培养箱(温度25℃,相对

湿度70%)中进行培养,所羽化的蜂即为四环素处理后的F₁代成蜂。待F₁代出蜂后随机挑取30头雌蜂,单蜂引入小试管中,喂以30%蜂蜜水并放入米蛾卵卡,置于常温(25℃)下,让其子代发育至成蜂。同时取约100头F₁代成蜂于涂有同样质量浓度的四环素蜂蜜水的大试管中进行繁育下一代,其后代即为四环素处理后的F₂代成蜂。每代短管赤眼蜂都进行以上处理,共重复8代。

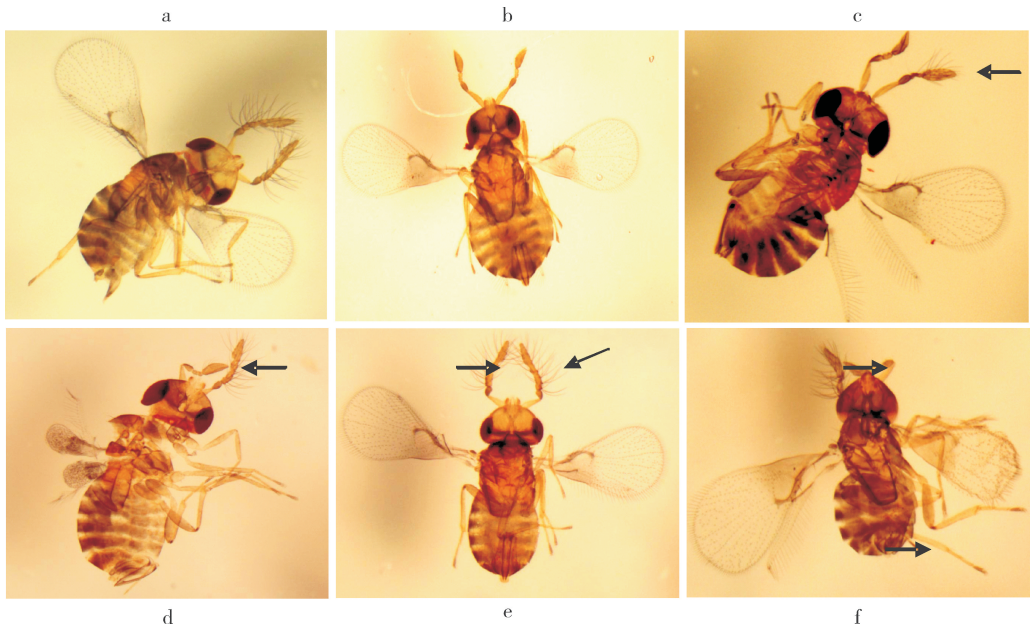
1.4 雌蜂生殖力和后代性比检查

待小试管中的每代短管赤眼蜂出蜂死亡后,在解剖镜下观察后代成蜂的性别,分别统计不同质量浓度四环素处理和不同高温处理下30个单管中的出蜂数、典型雌蜂数、雌雄嵌合体数和典型雄蜂数,并计算产雌率、产雌雄嵌合体率和产雄率,并用SAS统计软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 高温和四环素对赤眼蜂形态的影响

形态观察发现,经高温和四环素处理后,短管赤眼蜂后代出现了典型雌蜂、典型雄蜂和雌雄嵌合体的现象(图1)。雌雄嵌合体包括雌蜂单触角雄性化、双触角雄性化、单触角雄性化和产卵器退化等情况。



a. 典型雄蜂 Typical male; b. 典型雌蜂 Typical female; c~f. 不同程度的雌雄嵌合体 Intersexes of different kinds.

图1 高温和四环素处理后短管赤眼蜂的各种形态特征(×40)

Fig. 1 Morphological characteristic of *T. pretiosum* treated by high temperature and tetracycline(×40)

2.2 四环素对赤眼蜂后代性别和产卵量的影响

从表 1 和表 2 中可以看出, 3 种质量浓度的四环素连续处理短管赤眼蜂 8 个世代后, 短管赤眼蜂每代都出现了典型雌蜂、典型雄蜂和雌雄嵌合体现象。经不同质量浓度四环素处理后的短管赤眼蜂各代($F_1 \sim F_8$) 平均产卵量均显著低于未处理的短管赤眼蜂(F_0) 平均产卵量(58.85 粒), 1、10、100 mg/mL 3 种质量浓度的四环素处理后, F_2 代平均产卵量达到了最低, 分别为 11.67、16.55、12.06 粒, F_3 代以后平均产卵量又开始逐渐上升, 到了 F_7 和 F_8 代平均产卵量均高于 F_1 代。

由表 1 可知, 3 个不同质量浓度四环素连续处理短管赤眼蜂 8 个世代后, 其雌性百分率总体上基

本呈现下降的趋势, 也就是雄蜂和雌雄嵌合体百分率之和总体上基本呈现上升的趋势。1 mg/mL 的四环素处理 $F_1 \sim F_3$ 代, 10 mg/mL 的四环素处理 F_1 、 F_2 、 F_4 代和 100 mg/mL 的四环素处理 $F_1 \sim F_2$ 代较未处理代(100%) 差异不显著, 而其他各代则均差异显著。另外, 短管赤眼蜂各相邻代别之间的雌性百分率差异均不显著。

由表 2 可知, 3 个不同质量浓度四环素处理后的各代出现了不同百分率的雌雄嵌合体和雄蜂, 1 mg/mL 的处理中 F_1 代没有雄蜂的出现, 但有雌雄嵌合体 5.69%。每个质量浓度处理每 2 个相邻处理世代之间出现的雌雄嵌合体百分率和雄蜂百分率均出现了波动不定的现象。

表 1 四环素处理后短管赤眼蜂的产卵量和雌雄百分率¹⁾

Table 1 Fecundity and female percentage of *T. pretiosum* treated by tetracycline

世代 Generation	产卵量/粒 Fecundity			雌性百分率/% Female percentage		
	1 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL	1 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL
F_0	58.85±3.37 a	—	—	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
F_1	33.6±1.82 d	30.15±1.77 c	28.42±2.09 bc	94.31±1.82 abc	93.20±1.36 abc	86.99±1.71 abcd
F_2	11.67±1.34 f	16.55±1.32 e	12.06±1.4 f	88.84±1.93 abc	90.5±1.71 abcd	94.42±1.37 ab
F_3	20.8±1.87 e	22±1.89 de	25.64±1.62 bcd	86.81±1.94 abc	81.32±4.70 de	80.10±3.54 bcde
F_4	28.89±2.49 d	21.06±1.85 de	28.89±2.49 def	83.51±3.46 cde	96.02±1.12 ab	83.51±3.46 bcde
F_5	33.32±2.72 d	24.8±2.41 cd	24.65±2.56 bcd	76.53±2.41 def	69.55±3.64 f	72.01±5.68 ef
F_6	31.4±2.35 d	39.35±1.58 b	26.6±1.79 bcd	78.03±4.41 de	74.68±2.82 ef	70.47±4.52 ef
F_7	40.65±1.75 c	40.05±2.45 b	30.85±2.47 b	77.61±2.67 de	68.76±3.53 f	61.28±5.64 f
F_8	48±3.63 b	44.2±3.98 b	31.3±2.56 b	74.62±2.66 ef	66.24±2.61 f	71.16±4.28 ef

1) 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著(DMRT法)(下表同)。

The data in the table are mean±SE, the data in the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (DMRT)(the same as the following tables).

表 2 四环素处理后短管赤眼蜂雌雄嵌合体和雄蜂的百分率

Table 2 Intersex and male percentage of *T. pretiosum* treated by tetracycline

世代 Generation	雌雄嵌合体百分率/% Intersex percentage			雄蜂百分率/% Male percentage		
	1 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL	1 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL
F_0	0.00±0.00 g	0.00±0.00 g	0.00±0.00 f	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 e
F_1	5.69±1.82 def	4.85±1.12 efg	8.83±1.36 bcde	0.00±0.00 d	1.95±0.71 de	4.18±1.09 cde
F_2	4.92±0.87 ef	7.3±1.69 def	2.90±0.84 ef	6.24±1.63 bcd	2.14±1.02 de	2.41±1.23 de
F_3	8.94±1.76 bcde	5.71±2.08 defg	12.93±2.85 abcd	4.25±1.06 bcd	12.96±3.43 abc	6.97±1.95 bcde
F_4	7.43±1.75 cde	2.41±0.78 fg	7.43±1.75 cdef	9.06±2.09 abc	1.57±0.63 de	9.06±2.09 bcde
F_5	12.06±1.48 bc	25.01±3.38 a	11.21±1.9 bcd	11.41±2.58 ab	5.44±1.39 cde	16.78±5.44 abc
F_6	14.43±2.49 ab	15.85±2.26 bc	20.01±2.96 a	7.54±2.14 bcd	9.47±1.09 bcd	9.52±2.74 bcde
F_7	11.56±1.53 abc	10.95±1.68 cd	15.78±2.55 ab	10.83±7.45 ab	20.29±2.89 a	22.93±4.87 a
F_8	19.23±3.16 a	16.55±1.54 b	14.37±2.86 abc	6.15±2.19 bcd	17.21±2.53 ab	14.88±2.43 abcd

2.3 高温对赤眼蜂后代性别和产卵量的影响

由表 3 可知, 33 °C 高温连续处理 2 代后, 短管赤眼蜂产雄率达到了 100%, 恢复了完全孤雌产雄; 30 °C 高温连续处理 3 代后, 短管赤眼蜂也恢复完全孤雌产雄的现象。高温处理后短管赤眼蜂各代也有

少量的雌雄嵌合体出现, 但数量很少, 均不到 1%。同时, 短管赤眼蜂雌蜂的平均产卵量与未处理相比也显著降低。对照处理中, 短管赤眼蜂雌蜂的产卵量平均为 58.85 粒, 而高温处理则对其产卵量的影响差异不显著。

表 3 高温处理后短管赤眼蜂的产卵量、雌蜂、雄蜂和雌雄嵌合体的百分率

Table 3 Fecundity, female, male, and intersex percentage of *T. pretiosum* treated by high temperature

世代 Generation	33 °C				30 °C			
	产卵量/粒 Fecundity	♀/%	(♀+♂)/%	♂/%	产卵量/粒 Fecundity	♀/%	(♀+♂)/%	♂/%
F ₀	58.85±3.37 a	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	58.85±3.37 a	100.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
F ₁	37.70±3.47 b	76.25±3.02 a	0.89±0.30 a	22.87±2.91 b	46.40±2.91 b	70.80±3.65 a	0.73±0.35 a	28.47±3.66 b
F ₂	26.40±2.26 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	100.00±0.00 a	33.45±2.11 b	0.13±0.13 b	0.48±0.35 a	99.39±0.36 a
F ₃	—	—	—	—	—	0.00±0.00 b	0.00±0.00 a	100.00±0.00 a

3 讨论

试验结果表明,高温和四环素处理对短管赤眼蜂的性别有影响。本试验中,完全产雌孤雌生殖的短管赤眼蜂在被 33 °C 高温连续处理 2 代或 30 °C 高温连续处理 3 代后,由原来的完全孤雌产雌变成了完全孤雌产雄,说明高温能够快速将短管赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 完全杀死,其原因有待进一步深入研究。本试验分别用 1、10、100 mg/mL 3 种质量浓度的四环素连续喂饲成蜂处理短管赤眼蜂 8 代,均不能将短管赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 完全杀死,其原因可能是由于在喂饲成虫期不能保证所处理的赤眼蜂均能摄入足量的四环素;随着四环素处理代数的增加,短管赤眼蜂雌雄嵌合体和雄蜂的比率整体上呈现出上升趋势,是否随着处理代数的增加,四环素可在赤眼蜂体内逐渐积累,从而对 *Wolbachia* 的灭活作用也在逐渐增强,对此还有待进一步深入研究。

试验结果还表明,高温和四环素处理对短管赤眼蜂的产卵量也有影响。四环素处理后,短管赤眼蜂雌蜂的产卵量与未处理的对照相比显著降低,单雌产卵量在 F₂ 代达到最低,随后又呈上升趋势,到了 F₇ 和 F₈ 代平均产卵量均高于 F₁ 代,说明四环素杀死短管赤眼蜂体内的 *Wolbachia* 的同时,对短管赤眼蜂的生殖能力产生了显著的影响。随处理代数的增加,短管赤眼蜂对四环素产生了一定程度的适应能力,表现为产卵量的逐渐恢复,但还是显著低于未处理代的短管赤眼蜂。Grenier 等^[12]通过在产雌孤雌生殖的短管赤眼蜂人工卵液中添加四环素而彻底消除了 *Wolbachia*,处理后不含 *Wolbachia* 短管赤眼蜂的平均产卵量也较未处理的短管赤眼蜂明显降低,其结果与本试验结果相似。高温处理后,短管赤眼蜂雌蜂的产卵量与未处理的对照相比也显著降低。Saljoqi 等^[13]的研究结果表明,29 °C 和 33 °C 高温可以显著降低玉米螟赤眼蜂的生殖力。短管赤眼

蜂受高温影响,生殖能力也显著下降,肯定有高温的作用因素,但高温同时也杀死了 *Wolbachia*。*Wolbachia* 在其中的作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王玉玲,肖子清. 中国赤眼蜂研究与应用进展[J]. 中国农学通报,1998,14(1):43-44.
- [2] 潘雪红,陈科伟,吕燕青,等. *Wolbachia* 对赤眼蜂的性别调控机制及生理影响[J]. 昆虫知识,2007,44(1):32-36.
- [3] STOUTHAMER R,LUCK R F,HAMILTON W D. Antibiotic cause parthenogenesis *Trichogramma* to revert to sex[J]. Proc Natl Acad Sci,1990,87:2424-2427.
- [4] STOUTHAMER R,WERREN J H. Microorganisms associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma* [J]. J Invertebr Pathol,1993,61:6-9.
- [5] CHEN B,KFRI R,CHEN C N. The thelytokous *Trichogramma chilonis* in Taiwan[J]. Entomol Exp Appl,1992,65:187-194.
- [6] ROUSSET F,BOUCHON D,PINTUREAU B, et al. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods [J]. Proceeding Royal Society London, 1992,250:91-98.
- [7] LOUIS C,PINTUREAU B,CHAPELLE L. Recherches sur l'origine de l'unisexualite: la theromotherapie elimine a la fois rickerssiws et parthenogenese thelytoque chez un *Trichogramma*(Hym., Trichogrammatidae)[J]. Acad Sci Paris, 1993,316:27-33.
- [8] STOUTHAMER R,LUCK R F. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*[J]. Entomol Exp Appl,1993,67:183-192.
- [9] PINTUREAU B. Frequency and geographical distribution of thelytokous parthenogenesis in European species of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) [J]. Norw J Agric Sc,1994,16(suppl.):411.
- [10] PINTUREAU B,LOUIS C,CHAPELLE L. Symbiosis between micro-organisms and *Trichogramma* (Hymenoptera Trichogrammatidae): use in biological control[J]. Bull Soc Zool, 1993,118(2):159-167.
- [11] PINTUREAU B,CHAPELLE L,DILOBEL B. Effect of repeated thermic and antibiotic treatments on a *Tricogramma* (Hym., Trichogrammatidae) symbionts[J]. J Appl Entomol,

1999, 123:473-483.

[12] GRENIER S, GOMES S M, PINTUREAU B, et al. Use of tetracycline in larval diet to study the effect of *Wolbachia* on host fecundity and clarify taxonomic status of *Trichogramma* species in cured bisexual lines[J]. *Journal of Invertebrate Pathol-*

ogy, 2002, 80:13-21.

[13] SALJOQI A U R, HE Y R. Effect of temperature on the development of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)[J]. *Journal of South China Agriculture University*, 2004, 25(4):43-46.

Effect of High Temperature and Tetracycline on Thelytokous Parthenogenesis *Trichogramma pretiosum* Riley Induced by *Wolbachia*

PAN Xue-hong^{1,2} HE Yu-rong¹

1. *Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;*
2. *Guangxi Sugarcane Research Institute, Nanning 530007, China*

Abstract The *Trichogramma* larvae were raised under constant high temperature (30 °C and 33 °C) 24 hours after being hatched and their adults were fed with tetracycline of different concentrations (tetracycline+30% honey water; 1, 10, 100 mg/mL). The effects of the above treatment on the sex and egg production of the thelytokous parthenogenesis *Trichogramma pretiosum* were studied. The results showed that high temperature had a great effect on *T. pretiosum*, which would become arrhenotoky. It showed that high temperature can kill *Wolbachia* rapidly. Compared with the untreated *T. pretiosum*, *T. pretiosum* growing in high temperature had lower egg production and some intersexes (less than 1%) emerged. The effect of tetracycline on the sex and the egg production of *T. pretiosum* was also studied. Adults of completely thelytokous parthenogenesis *T. pretiosum* were continuously provided with tetracycline+30% honey water. After treatment there were some males and intersexes appearing in each generation. Most of the progeny were still females. After continuous treatment of 8 generations with different tetracycline concentrations, the mean number of eggs laid by treated *T. pretiosum* adults had a decrease tendency at first, and reached the least at F₂. And the fecundity tended to ascend later, and the mean number of eggs at F₇ and F₈ was even higher than that of F₁. The mean number of eggs of each generation by tetracycline treatment was distinctly less than that of the untreated (F₀).

Key words *Trichogramma pretiosum* Riley; high temperature; tetracycline; *Wolbachia*; egg production

(责任编辑:陈红叶)