

# 腰带长体茧蜂卵和早期胚胎体外发育的初步研究\*

胡建<sup>1</sup>, 刘峰<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 北京大学蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

**摘要:**通过在体外条件下培养腰带长体茧蜂侧输卵管处解剖得到的脱去滤泡细胞的成熟卵及从寄生早期幼虫血淋巴中获得的初期胚胎, 对腰带长体茧蜂卵和胚胎的初期发育进行了初步的研究。结果表明, 以 TC-100 为基础培养基加入一定量寄生幼虫血浆和胎牛血清时, 从侧输卵管处解剖得到的卵在合适的体外培养条件下可以进行卵裂, 且卵裂产生的初级胚胎可以被释放到培养基中。初级胚胎可以在胚外膜内进行分裂生成二级胚胎细胞, 但二级胚胎不能被释放出胚外膜。从寄生初期寄生幼虫体内得到的初级胚胎可以在体外培养条件下长大并持续通过胚外膜凹陷进行增殖, 但无法进入个体发育阶段, 胚胎最后黑化死亡。

**关键词:**卵; 胚胎; 多胚发育; 体外培养; 腰带长体茧蜂

**中图分类号:** Q 965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 01-0083-05

多胚发育是一种比较奇特的发育方式, 在昆虫中只存在于包括茧蜂科在内的少数种类中<sup>[1]</sup>, 通常一只蜂卵可以繁殖出数十后代, 多时可达几千个<sup>[2-3]</sup>。目前对多胚发育的寄生蜂的发育研究还不够深入, 研究最多的是一种卵寄生蜂—佛州点缘跳小蜂<sup>[4-6]</sup>。佛州点缘跳小蜂的卵虽然微小 (80  $\mu\text{m}$   $\times$  60  $\mu\text{m}$ ), 但寄主卵个体较小, 且寄主卵内的组织质地较为均一, 比较容易解剖得到寄生蜂的卵。相比较从寄主幼虫内得到同样大小的卵就较为困难。

腰带长体茧蜂是茧蜂科中的一种多胚发育的幼虫内寄生蜂, 目前还没有详细的关于其卵及早期胚胎发育的报道。腰带长体茧蜂的蜂卵微小 (100  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$ ), 卵壳较薄, 颜色半透明接近寄主幼虫体内组织的颜色, 很难与寄主的体内组织相区别。此外, 腰带长体茧蜂卵的卵裂较快。因此通过在寄主幼虫体内解剖到寄生蜂卵来研究卵的发育十分困难。此外, 腰带长体茧蜂的寄生时间极短, 为了保证寄生率, 寄生都是以群体的方式进行的, 其寄生时间一般设为 1 h, 这样在不同时间点寄生的卵的发育状况会存在较大的差异。因此通过定时解剖寄主幼虫研究其体内寄生蜂胚胎的发育状况很难得到比较精确的结果。

由于腰带长体茧蜂可以进行孤雌生殖, 它的卵在未受精的条件下也可以发育, 这为通过解剖蜂卵

巢侧输卵管基部的成熟卵进行培养, 以了解蜂卵及胚胎的早期发育过程提供了可能。关于卵寄生蜂的体外培养, 国内外已开展广泛研究, 最成功的例子是赤眼蜂的培养。但关于寄生幼虫的茧蜂科寄生蜂的体外培养, 目前只取得阶段性的结果, 如早期胚胎的体外培养或幼虫阶段的体外培养, 还没有成功地从卵培养到老熟幼虫的报导<sup>[7-8]</sup>。国内在寄生蜂体外培养上也做了大量研究<sup>[9]</sup>, 主要研究对象多集中于已商品化的并广泛应用于农林业的赤眼蜂、肿腿蜂等<sup>[9-10]</sup>, 但还没有关于幼虫内寄生茧蜂, 特别是具有多胚发育特性的寄生蜂的体外培养研究报道。

本文通过在体外条件下培养在腰带长体茧蜂侧输卵管处解剖得到的脱去滤泡细胞的成熟的卵及从寄生早期幼虫血淋巴中获得的初期胚胎, 对腰带长体茧蜂卵及胚胎的初期发育进行初步的研究, 期望通过此研究可以进一步明确多胚发育的腰带长体茧蜂的早期发育状况, 为将来将此蜂应用到农业害虫的防治提供有益的指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

腰带长体茧蜂 (*Macrocentrus cingulum* Brischke) 及其寄主亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 的饲养见 Hu 等<sup>[11]</sup>。

\* 收稿日期: 2007-09-14

基金项目: 国际科学基金资助项目 (C/3680-1); 国家自然科学基金资助项目 (30500059); 生物防治国家重点实验室开放课题资助项目 (2003-2, 2003-6)

作者简介: 胡建 (1974年生), 女, 讲师; E-mail: lsshj@mail.sysu.edu.cn

## 1.2 寄生

寄生条件同 Hu 等<sup>[11]</sup>, 寄生 1 h 后, 取出被寄生的亚洲玉米螟幼虫放入人工饲料中饲养。

## 1.3 蜂卵的收集

将已交配过的寄生蜂雌蜂放在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中速冻 5 min 后取出, 体表用  $\varphi = 75\%$  乙醇消毒后放入盛有抗生素的 Pringle's 昆虫生理盐水 (氯化钠 154 mmol/L、氯化钾 2.7 mmol/L、氯化钙 14 mmol/L、葡萄糖 22.2 mmol/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的解剖皿中。在解剖镜下用眼科镊拉出蜂尾, 取下卵巢, 轻轻分离卵巢管, 这时成熟的卵会散出来, 用自制毛细吸管收集散落出的蜂卵, 转入盛有 TC-100 培养基的 1.5 mL 离心管中。

## 1.4 蜂胚胎的收集

由于其多胚发育的特性, 在寄生后 1~2 d 期间会有大量的蜂胚胎细胞游离在寄主的血淋巴中。由于培养所需的胚胎数量不多, 我们采用剪去寄生初期 (1~2 d) 寄主幼虫腹足, 直接将血淋巴滴入盛有 TFAP 培养基的离心管中的方法来收集蜂早期胚胎。

## 1.5 亚洲玉米螟幼虫血浆的制备

取亚洲玉米螟五龄初期幼虫, 体表用  $\varphi = 75\%$  乙醇消毒。每 30 头放入一个试管中,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴加热 10 min 防止血淋巴黑化。待虫体自然晾干后, 剪开幼虫的一只前足, 轻轻挤出血淋巴滴在 Parafilm 膜上, 然后用移液器迅速收集到 1.5 mL 离心管中。待收集满 1 mL, 分别以 500 g 和 12 000 g 的离心力在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下离心血淋巴各 5 min, 以分别除去血细胞和变性的蛋白质。最后得到的上清血浆在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.6 蜂卵和胚胎的体外培养

将解剖到的蜂卵静置 5 min, 待蜂卵自然沉降后用移液器移去上层培养基, 再加入新的洗卵用 TC-100 培养基 (TC-100、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素) 清洗蜂卵, 重复 2 次。最后加入 TFAP 昆虫细胞培养基 (TC-100 (Invitrogen)、 $w = 10\%$  胎牛血清 FBS (Invitrogen)、Antibiotics (青霉素 100 U/mL、链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $w = 10\%$  寄主血浆 Plasma), 轻轻吹打后转入细胞培养瓶。培养瓶置于培养箱中在  $(25 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件下培养。每隔 2~3 d 从培养瓶中取出 2/3 的培养基, 然后加入新的 TFAP 培养基。更换培养基时不用离心, 只需吸出上层, 并加入新培养基即可。定时使用倒置显微镜 (Nikon) 观察培养瓶中卵或胚胎的发育状况并拍照记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 体外培养条件下蜂卵的发育

侧输卵管中的成熟蜂卵可以在 TFAP 培养基中进行卵裂。膜翅目昆虫中的部分种类可以进行孤雌生殖, 即未受精卵也可以发育并产生后代, 但后代的性别为雄性。实验观察表明腰带长体茧蜂也具有孤雌生殖的特性, 而且单雄茧的后代个体数量与混合茧和单雌茧没有明显差别。腰带长体茧蜂的卵呈长椭圆, 略向一侧弯曲 (图 1a)。培养 1 d 后的卵的外侧卵壳略向外凸出, 此处的卵壳变薄。此时卵内已经进行多次卵裂而产生了大量的胚胎细胞 (图 1b)。当卵壳内胚胎细胞的数量增大到一定程度, 胚胎产生的压力会使胚胎细胞冲破卵壳释放到培养基中 (图 1c)。在培养基中可以观察到胚胎完全释放后留下的卵壳 (图 1d)。这些结果表明取自蜂卵巢侧输卵管处的已脱去滤泡细胞的成熟蜂卵可以在体外培养的条件下进行一定程度的发育, 但发育进程与在寄主体内相比明显缓慢。一般情况下, 寄生蜂将卵产入寄主体内 2 h 左右, 初级胚胎细胞就基本开始被释放了。而在体外培养下要 1 d 左右。但这也与卵的发育状态有关, 由于我们进行培养的卵是取自侧输卵管的, 虽然它已经脱去滤泡细胞不再进行营养吸收, 但在自然情况下在它被产入寄主体内之前还要经过总输卵管和尾针, 在这个过程中卵的成熟程度可能会进一步加强, 在寄主幼虫体内所需要的发育时间就相对减少了。

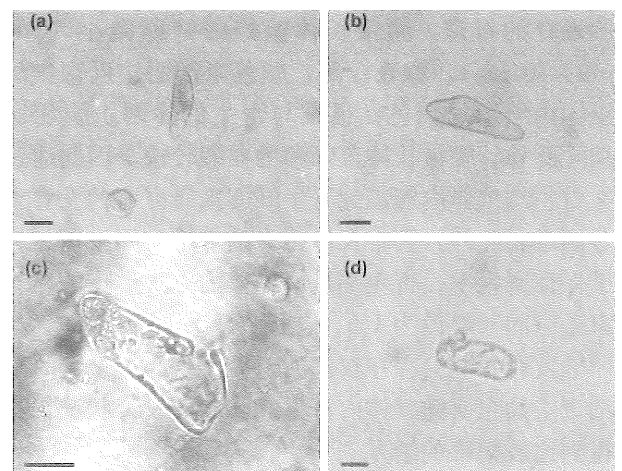


图 1 体外培养条件下腰带长体茧蜂卵的发育

Fig. 1 *In vitro* development of *Macrocentrus cingulum* eggs  
a: 卵及从卵中释放的初级胚胎细胞; b: 蜂卵外侧略微向外凸起; c: 蜂卵内经多次卵裂形成的初级胚胎细胞从卵壳中释放出来; d: 残留的卵壳  
标尺 = 30  $\mu\text{m}$

## 2.2 卵培养产生的初级胚胎细胞在体外条件下的发育

初级胚胎可以在胚外膜内分裂形成二级胚胎,但不能将其释放。与单胚发育相比较,多胚发育的过程要相对复杂。在胚胎进入个体发育之前要有由卵产生初级胚胎细胞,初级胚胎细胞分裂产生二级胚胎细胞,二级胚胎细胞的增殖几个过程。初由卵释放的初级胚胎细胞直径在  $20\ \mu\text{m}$  左右,其细胞外膜较薄,细胞质也较稀薄,细胞内部很难观察到有细胞分裂的迹象(图 2: a)。在蜂卵开始培养后的第 2~4 天,初级胚胎细胞不断增大,直径由起初的  $20\ \mu\text{m}$  增长到约  $150\ \mu\text{m}$ 。在这个过程中,胚胎仍保持圆形,胚胎内部活动比较剧烈,持续分裂形成大量的二级胚胎细胞,同时胚外膜也逐渐增厚,形成桑葚胚(图 2: a, b, c)。到培养后第 6 天,胚内细胞数目继续增多,胚胎大小也增加到  $200\ \mu\text{m}$  左右,此时胚胎细胞之间紧密结合,胚内没有空腔。在这个阶段,部分胚胎可以通过胚外膜的缢缩增殖(图 2: d)。培养后第 8 d 胚内二级胚胎细胞已清晰可辨,且细胞大小明显增大,此时胚外膜仍然较厚,厚度约有  $10\ \mu\text{m}$  左右,与在寄主体内

发育的胚胎外膜不超过  $2\ \mu\text{m}$  的厚度相比差异较大(图 2: e)。但直至培养到 40 多天后胚胎死亡,二级胚胎细胞也无法从一级胚胎细胞内释放出来,从而无法进入个体发育状态。但在培养过程中,胚胎可以不断的通过胚外膜的缢缩进行持续的增殖,最终胚胎因黑化而死亡(图 2: f)。

这个阶段的发育情况与在寄主体内的发育情况差异较大。在自然条件下,寄生蜂卵产入寄主体内 8~9 d 时,已有部分一龄幼虫孵化,而在体外培养下却还停留在自然条件下蜂卵产入寄主幼虫体内 3 d 左右时的状态,胚胎的生长大大的滞后了。此外,末期桑葚胚胚外膜的厚度明显厚于自然条件下生长于寄主体内的胚胎,这很有可能是二级胚胎细胞无法释放的一个主要原因。二级胚胎被限制在胚外膜内,只能通过胚外膜来吸收营养,而胚外膜的表面积远远小于所有二级胚胎表面积的总和,因此胚胎在胚外膜内得到的营养物质远远小于它们游离在寄主血淋巴中得到的营养,因此可能不能满足它们生长的需要,因此发育被停滞在早期胚胎状态。

## 2.3 寄主体内收集的胚胎在体外培养条件下的发育

在寄主体内部分发育的胚胎可在体外进行强烈的生长和增殖但不能释放二级胚胎细胞。由于只有极少量的卵可以在 TFAP 培养基中进行正常的生长发育,并释放出初级胚胎细胞。因此,我们期望通过直接培养在寄主体内已经发育到一定阶段的初级胚胎细胞来明确腰带长体茧蜂胚胎细胞初期发育的一些细节。结果表明无论是在寄主体内初释放的还是已经发育了一段时间的初级胚胎细胞经过培养都无法从初级胚胎进入到二级胚胎阶段。此时培养的胚胎的胚外膜的厚度更接近于在寄主体内生长时的厚度,同卵释放的胚胎的一个明显的区别是在某些个体中,胚外膜已经明显与膜内细胞分离,膜边缘界限比较清晰,但二级胚胎细胞还是无法从胚外膜中被释放出来(图 3: a)。培养一段时间后,胚胎形状开始变的不规则,不再保持圆形或近圆形的形状,并且持续的通过胚外膜的缢缩进行增殖,维持着较快的生长速度(图 3: a, b)。但在部分胚胎中发现了一些明显凹陷的圆形斑,与在体内生长条件下胚胎原基初形成的状态十分的相似,但是通过长期的培养并没有得到有进一步发育的结果(图 3: b)。

在寄主体内发育了一段时间后再到体外培养的胚胎的生长能力明显强于直接通过卵培养得到的胚胎。但与在体内发育的状况相比,发育程度明显滞

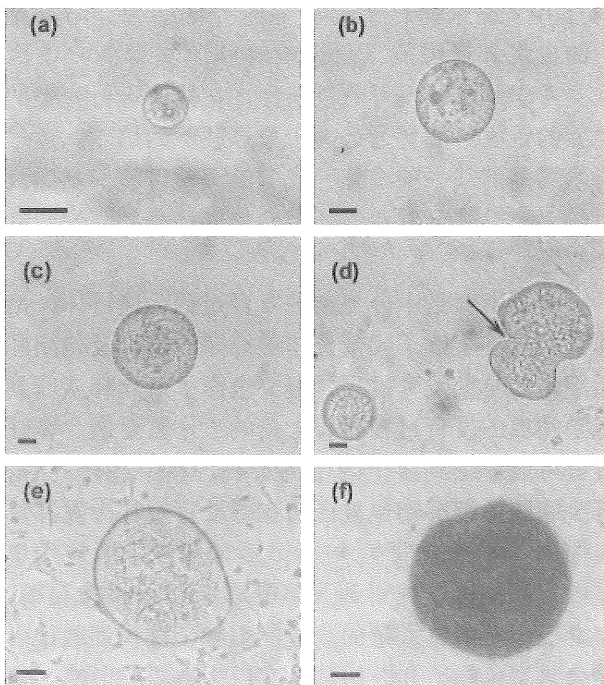


图 2 卵培养出的初级胚胎细胞在体外条件下的发育

Fig. 2 *In vitro* development of primary embryonic cells which came from cultured eggs

a: 培养 1 d 后的胚胎; b: 培养 2 d 后的胚胎; c: 培养 3 d 后的胚胎; d: 培养 5 d 后的胚胎; e: 培养 7 d 后的胚胎; f: 培养 40 d 后已经死亡的胚胎

标尺 =  $30\ \mu\text{m}$

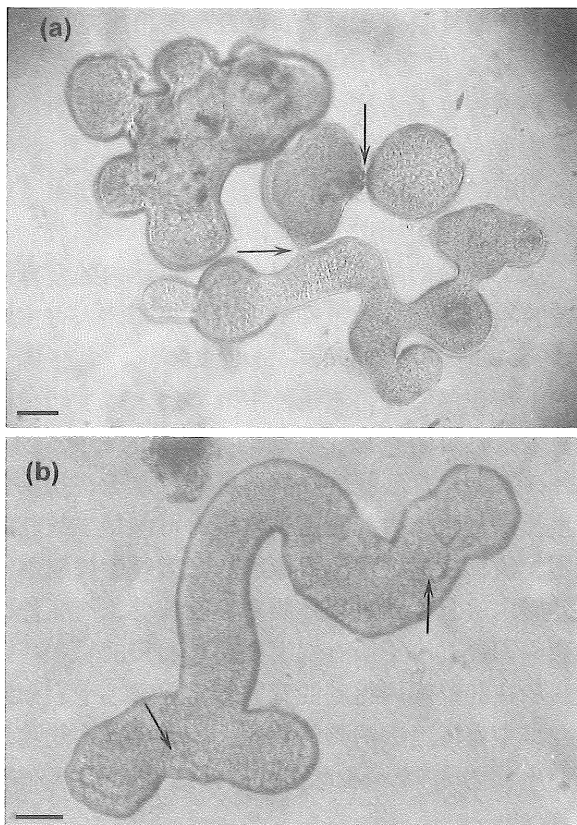


图 3 在寄主幼虫体内收集的胚胎在体外培养条件下的发育

Fig. 3 In vitro development of embryos dissected from host larvae hemocoel

a: 胚胎通过胚外膜的凹陷进行大量的增殖, 箭头示一些胚胎即将脱离; b: 一些胚胎内部形成清晰的圆形凹陷, 类似于初形成时的胚胎原基, 箭头示圆形凹陷  
标尺 = 70 $\mu$ m

后, 而且发育进程基本停滞在初级细胞持续分裂生成二级胚胎细胞阶段。表明寄主体内的营养环境对多胚的发育是非常关键的, 离开了这个环境, 胚胎的正常生长发育难以完成。

### 3 讨论

幼虫内寄生蜂的卵及早期胚胎发育是一个比较困难的研究题目, 卵的获得就是一个非常重要的限制因素。考虑到腰带长体茧蜂孤雌生殖的特性我们通过培养其未受精卵来初步了解卵及早期胚胎的发育情况。结果表明由卵产生初级胚胎细胞这个过程在体外培养的条件下与在寄主体内的状况基本相似。虽然初级胚胎被释放的时间可能拖后, 但卵初期的发育并没有受到体外环境的明显的影响。由卵产生的初级胚胎细胞分裂产生二级胚胎细胞的过程在进程上基本与在寄主体内的发育一致, 但发育时间明显延长, 且最致命的是二级胚胎细胞无法从胚

外膜中释放出来进入个体发育阶段。在寄主体内发育一段时间并没有对这个结果产生实质性的影响, 虽然体内的生长在某些方面增强了胚胎的发育, 如胚外膜变薄, 与膜内细胞分离等, 但所有的胚胎全部不能进入个体发育阶段。Fernando 对茧蜂 *Toxoneuron nigriceps* 寄生后寄主体内的营养成分变化分析表明, 在寄生后的前 2 h 内, 寄主体内的蛋白质和氨基酸水平没有发生明显的变化, 基本与未寄生幼虫相同。但是在寄生 2 h 后多分 DNA 病毒 (PDV) 对寄主体内的蛋白质和氨基酸含量与组成产生了明显的影响<sup>[12]</sup>。茧蜂 *Toxoneuron nigriceps* 是一种携带 PDV 的寄生蜂, 寄生初期 (2 h 内) PDV 的作用还不明显, 但 2 h 后其作用就非常明显了, 寄主体内成分的变化很大程度上是受到 PDV 的影响。因此, 对茧蜂 *T. nigriceps* 的培养, 其后期要调节培养基中的成分, 以保持和寄主体内的营养成分一致。但腰带长体茧蜂不携带 PDV 病毒, 其寄生后是否会对寄主体内成分产生明显影响, 目前还没有报道。由于准确判断亚洲玉米螟幼虫寄生与否需要解剖, 因此取寄生后的玉米螟血浆加入培养基中是很难实现的。我们在实验过程中也将未寄生幼虫血浆的含量分别增加到 20% 和 50%, 但也没能得到与 10% 血浆条件下有明显差异的结果。培养基中的血浆含量可能只是影响蜂胚胎发育的一个因素。考虑到多胚发育的复杂性, 在体外进行完整的培养的难度可能要远远大于单胚胚胎的培养。通过对培养基的某一种或几种成分的调整可能很难达到目的。对已部分发育的胚胎的培养已经部分说明这个问题。

多胚发育是十分复杂的发育过程, 通过体外培养我们基本了解了腰带长体茧蜂卵的发育及初期胚胎细胞的早期发育过程, 但要全面了解此蜂从卵到老熟幼虫的发育过程还有大量的工作需要做。多胚发育可能要受到多个因子的影响。在一些研究中, 寄主脂肪体裂解物也被证明在蜂发育过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。在被寄生 4~5 d 后的亚洲玉米螟幼虫体内, 我们可以观察到大量的脂肪体组织被裂解, 血淋巴中游离着大量的脂肪体细胞, 这些细胞很可能对寄生蜂卵和胚胎的发育产生重要的影响。这是我们后面的实验需要考虑的一个比较重要的因素。

致谢: 中山大学昆虫学研究所庞义教授实验室提供了部分实验条件, 杨凯副教授和何敏儿女士在实验过程中给予了诸多热心帮助, 在此一并表示感谢。

### 参考文献:

- [1] STRAND M R, GRBIC M. Development and evolution of

- polyembryonic insects [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 1997, 35: 121 - 160.
- [2] CRAIG S F, SLOBODKIN L B, WARY G A, et al. The 'paradox' of polyembryony: A review of the cases and a hypothesis for its evolution [J]. *Evolutionary Ecology*, 1997, 11: 127 - 143.
- [3] GRBIC M. Polyembryony in parasitic wasps: evolution of a novel mode of development [J]. *Int J Dev Biol*, 2003, 47: (7 - 8): 633 - 642.
- [4] GRBIC M, NAGY L M, STRAND M R. Development of polyembryonic insects: A major departure from typical insect embryogenesis [J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208: 69 - 81.
- [5] DONNELL D M, CORLEY L S, CHEN G, et al. Caste determination in a polyembryonic wasp involves inheritance of germ cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101: 10095 - 10100.
- [6] GIRON D, DUNN D W, HARDY I C W, et al. Aggression by polyembryonic wasp soldiers correlates with kinship but not resource competition [J]. *Nature*, 2004, 430: 676 - 679.
- [7] CONSOLI F L, VINSON S B. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2004, 137: 463 - 473.
- [8] KURIACHAN I, CONSOLI F L, VINSON S B. In vitro rearing of *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae), a larval endoparasitoid of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) from early second instar to third instar larvae [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52: 881 - 887.
- [9] 蒋学建, 周祖基, 杨伟. 我国寄生蜂离体培养研究进展 [J]. *四川林业科技*, 2005, 26(6): 28 - 32.
- JIANG Xuejian, ZHOU Zuji, YANG Wei. Proceedings on the studies on the culture of parasitoids *in vitro* in China [J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2005, 26(6): 28 - 32.
- [10] 黄琼, 周祖基, 杨伟, 等. 川硬皮肿腿蜂离体培养初探 [J]. *昆虫天敌*, 2005, 27(1): 43 - 48.
- HUANG Qiong, ZHOU Zuji, YANG Wei, et al. Primary Study on the Culture of *Scleroderma sichuanensis* Xiao (Hymenoptera: Bethyridae) in Vitro [J]. *Natural Enemies of Insects*, 2005, 27(1): 43 - 48.
- [11] HU J, ZHU X X, FU W J. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenee (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *J Insect Physiol.*, 2003, 49(4): 367 - 375.
- [12] FERNANDO L, CONSOLI F L, VINSON S B. Host regulation and the embryonic development of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2004, 137(4): 463 - 73.
- [13] FERKOVICH S M, DILLARD C, OBERLANDER H. Stimulation of embryonic development in *Microplitis croceipes* (Braconidae) in cell culture media preconditioned with a fat body cell line derived from a nonpermissive host, gypsy moth, *Lymantria dispar* [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1991, 18(3): 169 - 75.

## Preliminary Studies on the Development of Eggs and Early Embryos of *Macrocentrus cingulum in vitro*

HU Jian<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, SunYat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. State Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** The development of eggs and early embryos of *Macrocentrus cingulum* are preliminary studied by culturing the eggs without follicle cells dissected from wasps' lateral oviduct and early embryos dissected from parasitized host larvae hemolymph *in vitro*. The results show that eggs dissected from the lateral oviducts may cleave in the culture medium composed of TC - 100, plasma of larvae of its host *Ostrinia furnacalis* and fetal serum. Primary embryos are released from eggshell into the medium and subsequently cleaved into the secondary embryos. However, the secondary embryos within extraembryonic membrane can not be released. Early embryos dissected from host larvae hemocoel grow bigger in size and proliferate by the invagination of extraembryonic membrane, but they can not develop into the individual stage. Embryos cultured *in vitro* are finally dead in melanization.

**Key words:** eggs; embryos; polyembryonic development; *in vitro* culture; *Macrocentrus cingulum*