

文章编号:1003-8701(2015)06-0070-03

# 烟蚜茧蜂多分DNA病毒的形态特征与生理效应

李艳红<sup>1</sup>,刘金文<sup>2</sup>,颜秀娟<sup>2\*</sup>

(1.吉林农业工程职业技术学院,吉林四平136001;2.吉林省农业科学院,长春130033)

**摘要:**多分DNA病毒(polydnavirus, PDV)是一类共生于膜翅目姬蜂科、茧蜂科和蚜茧蜂科寄生蜂体内的昆虫病毒。在寄生过程中,伴随着蜂卵的产出,寄生蜂将PDV注入寄主体内,通过病毒基因的表达,破坏寄主的免疫,以保障后代的存活。本文首次在烟蚜茧蜂和蚜虫模式体系内发现多分DNA病毒,初步明确其形态特征和生理效应。

**关键词:**烟蚜茧蜂;多分DNA病毒;形态特征;生理效应

**中图分类号:**S476.3

**文献标识码:**A

## Morphological Characteristics of *Aphidius gifuensis* Polydnavirus and Its Physiological Effects

LI Yan-hong<sup>1</sup>, LIU Jin-wen<sup>2</sup>, YAN Xiu-juan<sup>2\*</sup>

(1. Jilin Agricultural Engineering Polytechnic College, Siping 136001;

2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Polydnaviruses (PDVs) have a symbiotic association with hymenopteran parasitoid wasps in the family of Braconidae, Ichneumonidae and Aphidiidae. They are delivered into host hemolymph accompanying with the parasitoid egg laid during oviposition to serve to disrupt host immune system to ensure the survival of the wasps' progeny. Recent progress on braconid PDV characterization and gene families including PTP and EP 1-like related to immune suppression was reviewed. The morphological characteristics and physiological effect of polydnavirus were firstly discovered in *Aphidius gifuensis* and aphids mode system.

**Key words:** *Aphidius gifuensis*; Polydnavirus; Morphological characterization; Physiological effects

PDV被寄生蜂注射入寄主昆虫体内,能调节寄主的生理功能,保证寄生蜂在寄主体内的成功发育<sup>[1]</sup>。研究表明,在寄生蜂寄生寄主昆虫过程中,多种调控因子参与以保证寄生蜂成功寄生<sup>[2-4]</sup>。其中,多分DNA病毒直接侵染或间接作用于寄主浆细胞和颗粒细胞,改变寄主血细胞行为,抑制寄主的细胞免疫反应,使蜂卵免遭包裹<sup>[5-6]</sup>。PDV的这种免疫抑制作用方式在不同的系统是不同的。要进一步研究PDV对于调节寄主免疫及其他生理功能的机理,对其在寄主组织中的侵染及表达情况进行检测是不可避免的<sup>[7]</sup>。

笔者实验室建立烟蚜茧蜂和烟蚜系统,发现在烟蚜茧蜂雌蜂卵巢内亦含有PDV,在寄主体内不能复制但可以进行表达,以原病毒的形式整合在寄生蜂基因组中,并垂直传播给下一代,雄蜂也能够通过交配将其所含的病毒基因组传递给下一代雌蜂。本文就在烟蚜茧蜂体内首次发现并对PDV进行分离提纯并进行鉴定以及明确其生物学功能,以期将来进行更有效的研究,并揭示其作用机制。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试虫源

采用大小为(2×2×4)m<sup>3</sup>的双层繁蜂室(实验室自行设计)放置50盆(Φ=6~7cm)栽萝卜,当萝卜长成高于5cm时接入经鉴定的蚜虫,经蚜虫扩繁后,接入烟蚜茧蜂使其扩繁;栽植的萝卜视其生长情况进行更换,更换时将带蚜叶片取下粘

收稿日期:2015-05-30

基金项目:国家自然科学基金项目(0017062)

作者简介:李艳红(1976-),女,硕士研究生,副教授,从事分子生物学研究。

通讯作者:颜秀娟,女,副研究员,在读博士,E-mail: yanxiujuan2000@126.com

附在新生长的叶片上,当蚜量增多时也可自然转移。每天收集僵蚜1次,置于大型指形管( $\Phi=2.5$  cm,  $h=10$  cm)中,放于 $0^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

### 1.1.2 烟蚜茧蜂卵巢的获得

待烟蚜茧蜂羽化出蜂后,取200头雌蜂放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中5 min使其麻醉,置于滴有1滴无菌生理盐水的载玻片上,用尖嘴镊子将腹部取下,解剖腹部末端,得到雌蜂生殖系统,将卵巢及输卵管取下,用无菌生理盐水清洗后放入冰浴的Ringer's溶液中。将解剖得到的卵巢放于玻璃匀浆器中匀浆,连同生理盐水吸入离心管中。

### 1.1.3 紫外光辐射处理雌蜂

用30W紫外灯光照射交配过的200头雌蜂3 h,分别寄生100头3~4龄若蚜。随后按上述方法让其寄生2龄末、3龄、4龄初若蚜,每日解剖20头被寄生各龄期寄主,观察各处理寄生蜂卵孵化情况。以未经照射处理的正常雌蜂寄生的同龄若蚜做比较,观察假寄生对寄主若蚜发育的影响,同时以未寄生的同龄若蚜作对照<sup>[8]</sup>。

### 1.1.4 被寄生蚜虫的解剖

将上述3~4龄若蚜200头分别放到100个指形管( $\Phi=1.0$  cm,  $h=5.0$  cm)中,再分别引入100头雌蜂,使每个指形管中有2头蚜虫和1头雌蜂,持续产卵1 h后,取出被寄生的烟蚜,放在75%的酒精中消毒,再用无菌生理盐水清洗除去杂质及酒精,然后将烟蚜放在滴有 $4^{\circ}\text{C}$ 冰冷的无菌生理盐水的载玻片上,用解剖针剔除虫体的前胸和翅,以一针按住腹部前端的腹面,用另一针自腹部前端背面起,轻轻拉开蚜虫体壁,再用自制的毛细吸管将血淋巴吸入到冰冷的离心管中备用。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 PDV的分离纯化

PDV的分离纯化参照Krell和Beckage等的方法<sup>[9-10]</sup>。用TL-18M型台式高速冷冻离心机在8000 r/min离心3 min,以去掉组织碎片,沉淀用Ringer's溶液洗1次后再离心1次,合并上清液,作为提纯PDV的样品。

将样品铺在25%~65%(W/V)的蔗糖连续梯度上,用Hitachi, P50离心机在48 000 r/min(HITACHI SCR20BC冷冻高速离心机 Hirachi koki Co. Ltd., Tokyo Japan 日立 RP 30 A 转头) $4^{\circ}\text{C}$ 下离心6 h。用毛细管收集沉降带后,再用Ringer's溶液洗1遍,在48 000 r/min  $4^{\circ}\text{C}$ 下再离心30 min,将沉淀溶于适量的Ringer's溶液中,于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.2.2 镜检

#### 1.2.2.1 取材

取上述所得的上清液,倒少量置于蜡板上的双蒸水中,静置15 min,使其自行扩散成悬浮液。

#### 1.2.2.2 制样

将敷有福尔莫瓦膜的载网漂浮在样品液滴上以沾取样品,用滤纸吸干余液,使样品在载网上仅有一薄层液膜;同时,用2%磷钨酸(pH6.8)染色1~2 min,用滤纸吸干多余的染液。

#### 1.2.2.3 微形态观察

在透射电子显微镜下进行微形态观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 形态学特性

用蔗糖密度梯度离心法提纯的病毒,可在第3条沉降带(蔗糖40%浓度)出现。经电镜观察,收集的沉降带及烟蚜茧蜂卵巢液中的病毒粒子如图1、图2所示。该病毒粒子呈多面体状,数量

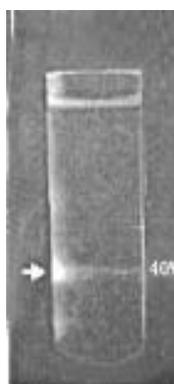


图1 25%~65%蔗糖密度梯度离心后PDV的沉降带

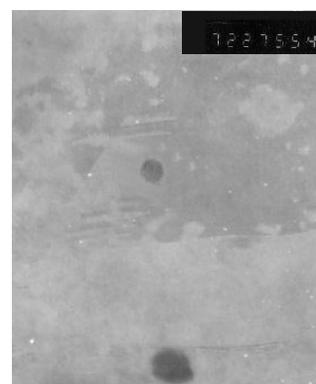


图2 烟蚜茧蜂卵巢液中多分DNA病毒

较少,无包涵体。可初步证明在烟蚜茧蜂卵巢液中有毒粒子存在。被寄生的桃蚜体内毒粒子呈多面体,形状与烟蚜茧蜂卵巢液中毒粒子相似,可认为该病毒粒子是烟蚜茧蜂产卵时携带进来的。

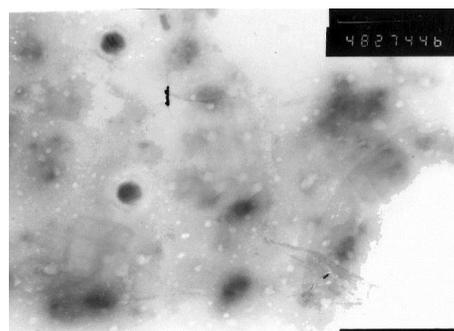


图3 寄生寄主体内的多分DNA病毒(箭头所示)  
(电镜照片 $\times 14000$ )

蚜茧蜂卵巢液和被寄生的蚜虫体液经过离心处理,经负染色,在透射电子显微镜下可观察

到病毒粒子,经确认是多分DNA病毒(图3)。本研究取材仅有100对烟蚜茧蜂的卵巢,经梯度离心提纯后,病毒粒子的浓度较小,因此在用电镜观察到的病毒粒子较少,应取材更多。

## 2.2 生理效应

经紫外光处理后的雌蜂都能正常产卵寄生,对被寄生寄主的发育历期进行连续解剖发现,96.4%±2.8%不能孵化,个别发育不完善,并且绝

大多数的蜂卵未能被寄主的免疫系统所识别而进行血细胞包囊。假寄生的2龄末、3龄和4龄初寄主若虫期延长,对一次假寄生的寄主而言,若虫期延长8~12 d,而多次假寄生的寄主,当发育到第11 d后,转化成僵蚜,说明PDV与复合因子剂量增加对寄生生长和发育有明显抑制作用<sup>[11]</sup>。4龄末蚜虫若虫被假寄生后,即使被过寄生6次,依然能正常发育,但随后转化成僵蚜(图4)。

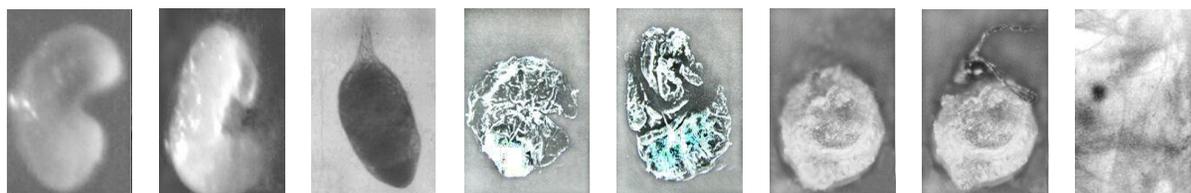


图4 假寄生后烟蚜茧蜂的发育

依次为:1、4龄幼虫; 茧; 预蛹; 蛹; 僵蚜; 正羽化的蜂; 被破坏的寄主组织

## 3 结论与讨论

本文证实烟蚜茧蜂体内存在多分DNA病毒,其功能是直接侵染或间接作用于寄主浆细胞和颗粒细胞,改变寄主血细胞行为,抑制寄主细胞免疫反应,破坏寄主免疫,使蜂卵免遭包囊以确保子代存活,对寄主生长和发育有明显抑制作用。

在病毒与寄主昆虫长期进化过程中,PDV可通过调节寄主的内分泌来加快或减慢寄主的发育等途径来调节寄主幼虫生长期的长短,如可通过降低保幼激素酯酶的活性<sup>[12]</sup>。但对于烟蚜茧蜂和蚜虫模式体系内PDV是如何作用于寄主,是否整合于寄生蜂的染色体上,进入寄主体内是以何种方式进行转染及表达<sup>[13-14]</sup>,以上所有情况尚需作进一步的研究。

未来在完全明确多分DNA病毒基因的功能和表达调控机理的基础上,可选用合适的昆虫转座子,以显微注射等方法将多分DNA病毒基因整合到害虫基因组中,培育出免疫力和繁殖力下降,发育紊乱的害虫品系,通过在田间散发这种转基因害虫,以达到控制种群的目的<sup>[15-16]</sup>。多分DNA的应用前景比较广阔,对它做进一步研究很有价值和意义<sup>[17]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Gaelen R. Burke and Michael R. Strand. Polydnviruses of parasitic wasps: Domestication of viruses to act as gene delivery vectors [J]. *Insect*, 2012(3): 91-119.
- [2] 刘金文, 颜秀娟, 丛斌. 烟蚜茧蜂畸形细胞对寄主生理代谢的调控[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(9): 368-371.
- [3] Khafagi W E, Hegazi E M, Showail S. Prediction studies on number of teratocytes and eggs of *Microplitis rufiventris* Kok. (Hym.,

Braconidae) parasitoid in superparasitized host larvae[J]. *Journal of Applied Entomology*, 1999, 123(1): 37-40.

- [4] 余海芳, 白素芬, 李欣. 茧蜂多分DNA病毒免疫抑制基因的研究进展[A]. 河南省植保学会第九次、河南省昆虫学会第八次会员代表大会暨学术讨论会论文集[C], 2009.
- [5] 尹懿. 菜蛾盘绒茧蜂多分DNA病毒基因在寄主小菜蛾幼虫体内转录模式的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [6] H Chiua and S Govind. Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2002(9): 1379-1381.
- [7] Ye X Q, Shi M, Chen X X. Origin and characteristics of polydnviruses carried by parasitoid wasps[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014(44): 342-350.
- [8] 刘金文, 李建平, 丛斌, 等. 烟蚜茧蜂畸形细胞发生及发育[J]. *植物保护*, 2008, 34(1): 62-66.
- [9] Stoltz D B, Krell P, Summers M D, et al. Polydnviridae-proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes[J]. *Intervirology*, 1984(21): 1-4.
- [10] Lavine M D, Beckage N E. Polydnviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction[J]. *Parasitol Today*, 1995(11): 368-378.
- [11] 李艳红. 烟蚜茧蜂毒蛋白对寄主生长发育的影响[J]. *吉林农业科学*, 2014, 39(4): 43-46.
- [12] 狄蕊, 陈亚锋, 陈学新, 等. 菜蛾盘绒茧蜂多分DNA病毒对寄主小菜蛾幼虫体内部分组织的影响[J]. *中国生物防治*, 2006, 22(4): 268-274.
- [13] Strand M R, Burke G R. Polydnviruses as symbionts and gene delivery systems[J]. *PLoS Path*, 2012(8): e1002757.
- [14] Gill TA1, Fath-Goodin A, Maiti II, et al. Potential uses of Cys-motif and other polydnvirus genes in biotechnology[J]. *Adv Virus Res*, 2006(68): 393-426.
- [15] Chen Y F, Gao F, Ye X Q, et al. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnvirus genome[J]. *Virology*, 2011(414): 42-50. (下转第79页)

### 3 讨 论

大豆胞囊线虫胞囊密度的大小,可以作为大豆胞囊线虫发病的指标。本研究24个试验点采集的土样中,胞囊密度较均匀且密度较大,所以本研究生理小种的鉴定结果较准确。

本试验得出结论大庆地区生理小种主要以3号小种为主,并混合有6号,13号和1号等生理小种,这与刘汉起等在对黑龙江省65个市(县)的土壤样品进行分析证实3号生理小种为黑龙江省的优势生理小种的结果一致。而安达地区则以14号小种为主,4号和9号小种为辅。田中艳等也曾经发现个别地块也存在4、14号生理小种。这可能是由于大庆地区大豆面积逐年在减少,而安达地区采样点的大豆连年种植因而使生理小种产生了变异,这样就需要对安达地区增加试验点以便验证是否安达所有地点小种都产生变异。并且应把实验地点扩大到整个黑龙江省,以达到生理小种监测的目的。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘汉起,商绍刚,甄鸿杰,等.黑龙江省大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)生理小种分布研究[J].大豆科学,1995,14(4):330-333.
- [ 2 ] 陈品三,齐军山,王寿华,等.我国大豆胞囊线虫生理分化

(上接第50页)

- [ 4 ] 李荣霞.不同施肥水平对紫花苜蓿产量、营养吸收及土壤肥力的影响[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [ 5 ] 范 富,徐寿军,张庆国,等.氮、磷、钾肥配施对紫花苜蓿产量及营养物质含量的影响[J].中国土壤与肥料,2011(2):51-56.
- [ 6 ] 侯 湃,刘自学,刘艺杉,等.北京平原区紫花苜蓿施肥组合试验[J].草业科学,2014,31(1):144-149.
- [ 7 ] 刘晓静,张进霞,李文卿,等.施肥及刈割对干旱地区紫花苜蓿产量和品质的影响[J].中国沙漠,2014,34(6):1516-1526.
- [ 8 ] 蔡国军,张仁陟,柴春山.半干旱黄土丘陵区施肥对退耕地紫花苜蓿生物量的影响[J].草业学报,2012,21(5):204-212.
- [ 9 ] 谢 勇,孙洪仁,张新全,等.坝上地区紫花苜蓿氮、磷、钾肥料效应与推荐施肥量[J].中国草地学报,2012,34(2):52-57.
- [ 10 ] 刘志英,李西良,李 峰,等.越冬紫花苜蓿根系性状与秋

(上接第72页)

- [ 16 ] Djoumad A, Stoltz D, Beliveau C, et al. Ultrastructural and genomic characterization of a second banchine polydnavirus confirms the existence of shared features within this ichnovirus lineage[J]. J Gen Virol, 2013(94): 1888-1895.

动态的鉴定和监测研究[J].植物病理学报,2001(4):336-341.

- [ 3 ] 齐军山,李长松,李 林.大豆胞囊线虫生理小种及其鉴定技术[J].中国油料作物学报,2000,22(4):71-74.
- [ 4 ] 田中艳,高国金,周长军,等.大豆胞囊线虫生理小种变异的研究[J].大豆科学,2007,4(2):290-292.
- [ 5 ] 刘维志,刘 晔,陈品三.东北地区部分市县大豆胞囊线虫生理小种的鉴定结果初报[J].沈阳农学院学报,1984(2):75-78.
- [ 6 ] 董丽民,许艳丽,李春杰,等.黑龙江省大豆胞囊线虫胞囊密度和生理小种鉴定[J].中国油料作物学报,2008,30(1):108-111.
- [ 7 ] 刘大伟,马朝旺,段玉玺.辽宁省大豆胞囊线虫病发生分布研究[J].吉林农业科学,2014,39(4):47-49.
- [ 8 ] 李 楠,李明姝,颜秀娟.大豆新品种(系)对大豆胞囊线虫3号生理小种的抗性鉴定[J].吉林农业科学,2008,33(2):34-35.
- [ 9 ] Riggs R D, Schmitt D P, Noel G R. Variability in race tests with *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 1988, 20(4): 565-572.
- [ 10 ] Riggs R D, Schmitt D P. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure[J]. Journal of Nematology, 1991, 23(2):149-154.
- [ 11 ] Golden A M, Epps J M, Riggs R D, et al. Terminology and identify of infra specific forms of the soybean cyst nematode(*Heterodera glycines*)[J]. Plant Disease Reporter,1970(54): 544-546.

(责任编辑:王 昱)

眠性的关系及其抗寒效应[J].中国农业科学,2015,48(9):1689-1701.

- [ 11 ] 赵 云.不同施肥管理下苜蓿生产力响应及平衡施肥模型[D].北京:中国农业科学院,2013.
- [ 12 ] 高祥照,马常宝,杜 森.测土配方施肥技术[M].北京:中国农业出版社,2005:8-12,21-84.
- [ 13 ] 刘艳楠,刘晓静.施肥对两个紫花苜蓿品种生产性能及营养品质的影响[J].甘肃农业大学学报,2014(1):111-115,120.
- [ 14 ] 陈 萍,沈振荣,迟海峰,等.不同施肥处理对紫花苜蓿产量和株高的影响[J].作物杂志,2013(1):91-94.
- [ 15 ] 丁瑞兴.黑土和黑钙土的有机无机复合体与结构性的关系[J].土壤通报,1980(6):11-16.
- [ 16 ] 马树庆,袁福香,周淑香.2004年吉林省农业气候及其对农业的影响概述[J].吉林气象,2004(4):8-10,16.
- [ 17 ] 储国良,丁剑英,付反生,等.南方丘陵坡地紫花苜蓿施肥效应初探[J].中国乳业,2002(5):17-19.

(责任编辑:王 昱)

- [ 17 ] 刘鹏程,时 敏,陈亚锋,等.菜蛾盘绒茧蜂多分DNA病毒EP-1-like基因克隆、原核表达与多克隆抗体制备方法[J].环境昆虫学报,2008,30(1):33-38.

(责任编辑:王 昱)