

# 致倦库蚊主要组织结构的石蜡切片观察

闫亮珍<sup>1,2</sup>, 乔传令<sup>2</sup>, 张建珍<sup>1</sup>, 马恩波<sup>1</sup>, 崔峰<sup>2,\*</sup>

(1. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006;

2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:** 【目的】蚊虫是传播人类多种疾病的重要媒介害虫, 对其组织形态学的认识是开展众多领域研究的基础。本文通过研究致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 成虫组织结构及形态, 为媒介蚊虫的抗药性研究及有效防治提供基础材料。【方法】采用改进的石蜡切片法和 HE 染色, 结合活体内脏器官解剖及光学显微镜观察, 从形态学和组织学水平对致倦库蚊组织结构做详尽展示。【结果】获得结构完整、染色清晰、定位准确的消化排泄系统、生殖系统、神经系统、呼吸系统等 HE 染色石蜡切片。【结论】探讨了改进制片和染色过程中一些步骤及注意事项。研究结果为利用原位杂交、免疫组化等方法研究蚊虫体内抗药性基因的准确定位及基因功能分析提供了可靠的基础。

**关键词:** 致倦库蚊; 石蜡切片; 组织结构; 解剖学; HE 染色

中图分类号: Q964 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)03-0373-08

## Histological observation of major structures of the mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using paraffin tissue section

YAN Liang-Zhen<sup>1,2</sup>, QIAO Chuan-Ling<sup>2</sup>, ZHANG Jian-Zhen<sup>1</sup>, MA En-Bo<sup>1</sup>, CUI Feng<sup>2,\*</sup> (1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** 【Aim】 Mosquitoes are important vectors of many human diseases. The knowledge of their histological structures is the basis of various researches. The histological and morphological structures of *Culex pipiens quinquefasciatus* exhibited in this study provide the basis for the research of insecticide resistance and control of mosquitoes. 【Methods】 Improved consecutive paraffin tissue sections, Hematoxylin-Eosin (HE) staining and organ dissection were performed to study the histological structures of *C. pipiens quinquefasciatus* on the levels of morphology and histology. 【Results】 The digestive, excretory, reproductive, nervous and respiratory systems of *C. pipiens quinquefasciatus* were obtained and demonstrated clearly. 【Conclusion】 Detailed and improved protocols of paraffin tissue section preparation and Hematoxylin-Eosin staining were discussed. This study provides the information of histological structures of *C. pipiens quinquefasciatus*, which will shed light on the exploration of gene functions of mosquito using *in situ* hybridization, immunohistochemistry, etc.

**Key words:** *Culex pipiens quinquefasciatus*; paraffin tissue section; histological structure; anatomy; Hematoxylin-Eosin (HE) staining

蚊虫作为疟疾、登革热和乙脑等传染病的主要传播载体, 一直以来都是科学研究的重要对象。了解蚊虫的组织结构是开展许多研究的基础, 如明确病毒颗粒在蚊虫体内的组织分布对研究传染病的传播途径及防控有重要意义 (Faran *et al.*, 1986; Girard *et al.*, 2004), 明确抗药性基因在蚊虫体内的表达部位有助于认识其编码蛋白的功能 (Zhu *et al.*, 2010)。组织切片法是研究细胞与组织形态等最基

本的方法, 该方法能完整地保持组织的原始形态结构, 同时也能够较好地保存实验材料的 mRNA、DNA 和蛋白质等分子信息 (黄淇和赵瑞波, 2002), 这为利用原位杂交、免疫组化等技术研究感兴趣基因的表达与分布提供了良好的基础条件。目前关于昆虫的石蜡切片制作苏木精-伊红 (HE) 染色有诸多报道, 如尘螨 *Dermatophagoides pteronyssinus* 连续石蜡切片的制作及染色 (张莺莺等, 2007), 粘虫

基金项目: 卫生部科技重大专项 (2008ZX10004-010); 中科院动物研究所知识创新项目 (KSCX3-IOZ-4006)

作者简介: 闫亮珍, 女, 1984年生, 山西古交人, 硕士研究生, 研究方向为动物生化与分子生物学, E-mail: yanliangzhen1984@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cui@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2010-06-11; 接受日期 Accepted: 2011-01-27

*Mythimna seperata* Walker 幼虫石蜡切片的制作等(王海舟等, 2006), 但对蚊虫组织结构的研究报道甚微, 仅见对白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 的石蜡连续切片技术进行探讨的报道(谢超等, 2007)。国外也有学者利用电镜扫描进行组织结构的研究, 但研究重点主要集中于较容易观察和解剖的中肠(Schaefer *et al.*, 1967; Zieler *et al.*, 2000), 而对蚊虫整体组织结构的基础研究却受到忽视。

致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 是尖音库蚊复组 *Culex pipiens complex* 之一, 主要分布于我国南方, 是班氏丝虫和西尼罗河病毒的传播媒介。从 20 世纪 60 年代开始, 我国对于尖音库蚊的研究主要集中在抗药性方面, 如不同地理种群尖音库蚊的抗性羧酸酯酶(刘俊娥和乔传令, 2001; 崔峰等, 2005; 李春晓和赵彤言, 2006; Liu *et al.*, 2008), 抗药性动态及遗传多样性(吴中华等, 2009), 抗药基因的筛选、鉴定(田海生等, 2001; Gong *et al.*, 2005) 等。研究方法主要采用生物测定、酶活性检测、聚丙烯酰胺凝胶电泳、淀粉凝胶电泳和 Western 杂交等技术对蚊虫抗药性基因进行蛋白和分子水平的研究, 但对抗药基因在蚊虫体内的表达部位研究甚少。明确蚊虫的组织结构对许多基础研究都是非常必要的, 如研究与蚊虫传病相关的重要功能基因在蚊虫不同组织的表达模式, 蚊虫对杀虫剂产生抗性的重要基因和蛋白的组织表达, 这些研究都是基于对组织的清晰认识, 尤其是利用原位杂交和组织免疫组化的方法更离不开石蜡切片的制作和组织的辨认。本文采用琼脂糖包埋后再以石蜡包埋的方法制作蚊虫连续石蜡切片, 结合活体内脏器官的解剖, 对致倦库蚊的组织结构做了较系统的研究, 这可为利用原位杂交、免疫组化等方法研究蚊虫的重要功能基因提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 蚊虫的解剖

1.1.1 实验材料: 致倦库蚊: 2007 年 7 月采自深圳, 在实验室常年繁殖饲养, 条件是温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 光周期 14L:10D。实验用雌虫采用产卵后 1 d 成虫, 雄虫采用羽化后 3~4 d 成虫。

1.1.2 实验方法: 将 1 头蚊虫(雌虫或雄虫)放在培养皿置于冰上, 在解剖镜下用镊子去除腿。在虫体上滴加一滴生理盐水, 用解剖针和手术刀将虫体腹部侧面划开, 去除表皮。由于蚊子内部器官是透明的, 为了在解剖时不划伤器官, 在除去少部分表皮后滴加几滴苏木精染料, 几秒后被着色的器官轮廓清晰可见, 然后做更细致的解剖。最后在解剖镜

(Olympus, SZ61) 下观察、拍照。本实验中雌虫和雄虫各解剖 5 头, 挑选解剖完整的、质量好的拍照。

### 2.1 蚊虫连续石蜡切片的制备及染色

2.1.1 主要试剂及仪器: 石蜡(Leica), 多聚甲醛(PFA, Sigma), 苏木精(Sigma), 伊红(Sigma), 包埋机(Leica, EG1150C), 切片机(Leica, RM2135) 等。

2.1.2 蚊虫的固定: 将蚊虫置于冰上, 用镊子去除翅、足后浸入固定液。固定液: 0.25% TritonX-100; 4% 多聚甲醛(PFA)。常温下固定 4 h 后  $4^\circ\text{C}$  过夜, 然后置于 70% 乙醇中保存备用。

2.1.3 包埋: 将蚊虫按身体纵向分别摆放于塑料圆形小孔板中, 加入冷却到  $60^\circ\text{C}$  左右的 2% 琼脂糖, 然后置于  $4^\circ\text{C}$  迅速冷却, 该过程要避免虫体漂浮起来和气泡的产生。将冷却后的琼脂糖块从小孔板中取出, 置于包埋盒中。然后将上述方法处理过的蚊虫依次用不同浓度梯度的乙醇溶液逐级脱水, 备用。

2.1.4 脱水、透明和浸蜡: 将上述步骤获得的 2% 琼脂糖固定的蚊虫在 70%, 80%, 95%, 100% (I) 和 100% (II) 乙醇溶液中各浸泡 30 min; 透明: 在乙醇: 二甲苯(1:1 配制) 和二甲苯溶液中浸泡各 20 min; 浸蜡: 在二甲苯: 石蜡(1:1 配制)、石蜡(I)、石蜡(II) 溶液中浸泡各 1 h。最后, 用石蜡包埋机进行包埋。

2.1.5 切片: 将组织块修成较小的梯形方块, 用莱卡连续轮转式切片机进行连续切片, 切片厚度为  $5 \mu\text{m}$ 。将切片置于  $42^\circ\text{C}$  恒温水浴中展片, 然后分成 5~7 个小片段贴在多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 于  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中烘烤过夜。本实验共做了 6 头蚊虫(雌雄各 3 头)的石蜡切片。

2.1.6 HE 染色: 采用常规 HE 染色, 流程如下: ①用二甲苯将切片脱蜡 3 次, 每次 5 min, 再用 100% 乙醇洗 3 次, 每次 2 min, 然后用 95%, 80% 和 75% 乙醇各洗 2 min, 最后蒸馏水洗 2 min; ②滴加苏木精染色 5 min, 自来水冲洗 3~5 s; ③1% 盐酸乙醇(70%) 分化 30 s; ④自来水浸泡促蓝液返蓝 15 min; ⑤滴加伊红染色 2 min, 自来水漂洗 3~5 s; ⑥脱水、透明: 70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、100% 乙醇(I)、100% 乙醇(II)、二甲苯(I)、二甲苯(II) 二甲苯(III) 各 1 min; ⑦滴加中性树脂封片。将 6 头蚊虫的石蜡切片中各个组织角度好、染色好的切面挑选拍照。

## 2 结果

从蚊虫组织解剖观察(图 1: a) 和整体的 HE 石



图 1 致倦库蚊内部组织结构解剖图

Fig. 1 Internal anatomical structures of *Culex pipiens quinquefasciatus* adults

a: 雄性成蚊消化排泄结构与生殖结构 Digestive, excretory and reproductive systems of male adult; b: 腹支囊 Air sac; c: 背支囊 Back sac; d: 卵巢 Ovary. AS: 腹支囊 Air sac; BS: 背支囊 Back sac; E: 食管 Esophagus; HG: 后肠 Hindgut; MG: 中肠 Midgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules; T: 精巢 Testis; R: 直肠 Rectum.

蜡切片(图2)中可以看出,致倦库蚊的组织结构主要包括:消化排泄系统,如前肠(foregut)、中肠(midgut)、后肠(hindgut)、马氏管(malpighian tubules)和唾液腺(salivary glands)等;生殖系统,如卵巢(ovary)和精巢(testis);神经系统,如脑(brain)

和神经节(ganglia)等;感觉器官,如复眼(compound eye)等;呼吸系统,如腹支囊(air sac)和背支囊(back sac)等。

### 2.1 消化排泄系统

蚊虫的消化排泄系统主要包括前肠(咽、食

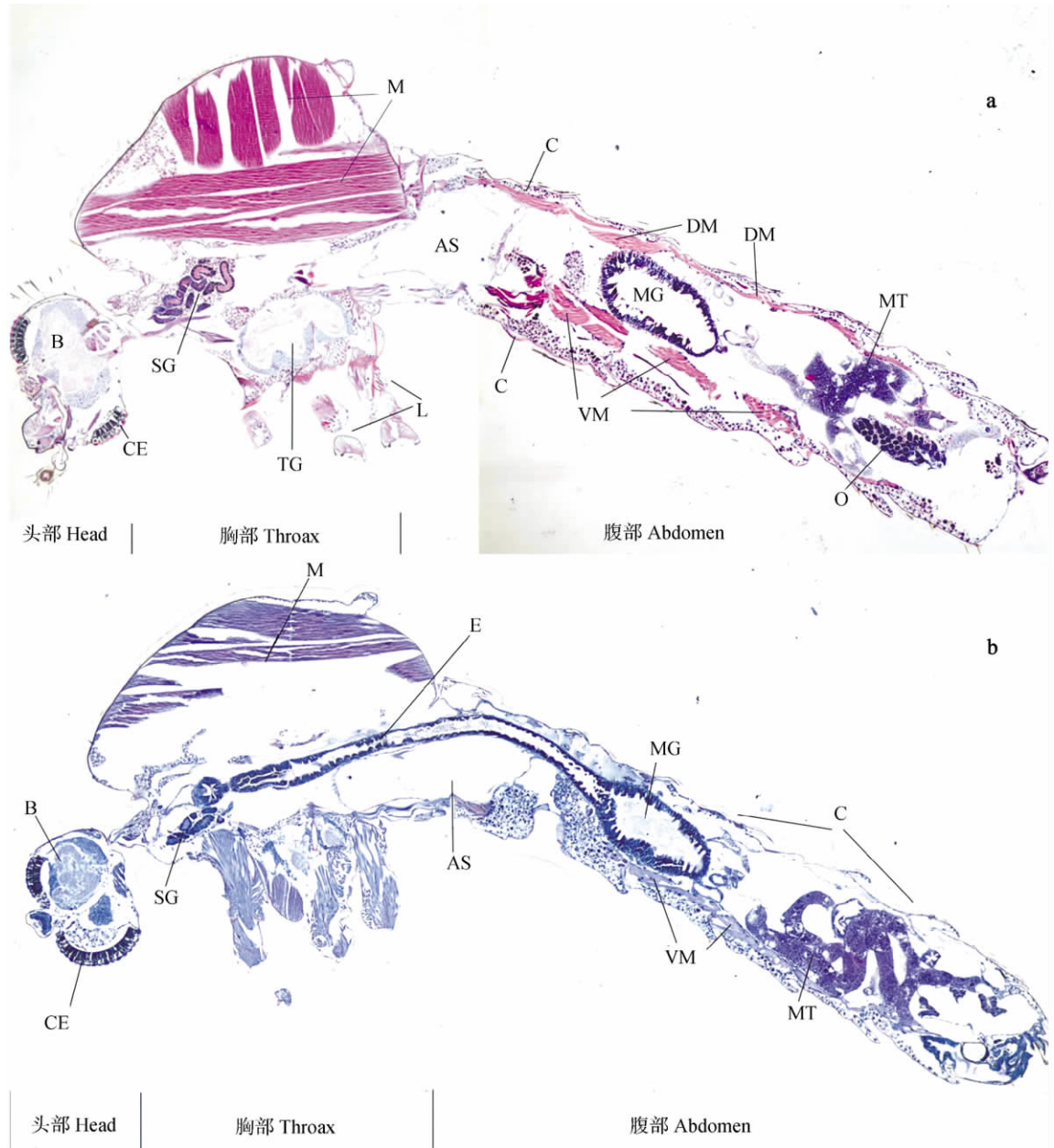


图2 雌性致倦库蚊石蜡切片 HE 染色整体图

Fig. 2 Overview of paraffin tissue sections of *Culex pipiens quinquefasciatus* female adults with HE staining

a, b 显示不同的切面图 a and b show different sections. AS: 腹支囊 Air sac; B: 脑 Brain; C: 表皮 Cuticle; CE: 复眼 Compound eye; DM: 背部肌肉 Dorsal muscle; E: 食管 Esophagus; L: 足 Legs; M: 肌肉 Muscle; MG: 中肠 Midgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules; O: 卵巢 Ovary; SG: 唾液腺 Salivary glands; TG: 胸神经节 Thoracic ganglia; VM: 腹部肌肉 Ventral muscle.

道)、中肠、后肠(前后肠、直肠)、马氏管和唾液腺等,消化系统在进行 HE 染色时嗜染性极强,细胞质被染成粉红或桃红色,细胞核为蓝紫色,形态清晰可见。中肠上皮细胞形态呈柱状紧密排列(图 3: c),而前肠和前后肠的细胞为单层扁平细胞(图 3: f),直肠细胞为单层排列的圆形细胞(图 4: b)。马氏管组织的细胞形态较大,着色较深,细胞核为深蓝色,细胞质为深紫色,细胞膜则为淡紫色(图 3:

f)。唾液腺组织形态比较规则(图 2: a; 图 3: a)。

### 2.2 生殖系统

卵巢和精巢在 HE 染色中呈现很强嗜染性,图 3(b)中有一半呈深蓝色颗粒状,而另一半则为不规则状浅蓝色,我们推测其为处于不同发育状态的精巢,即不规则浅蓝色部分处于发育后期,深蓝色颗粒状处于未发育或发育前期。图 3(d)、图 1(d)为雌性卵巢的形态结构,整个组织呈现深紫色。

2.3 感觉器官与神经系统

复眼作为蚊虫的感觉器官, 由许多小眼 (ommatidia) 组成, 经 HE 染色的复眼最外层弧形角膜呈现粉红色, 角膜晶体表面染成淡蓝色 (图 3: i), 内层晶锥细胞则为黑色 (图 3: h)。触角是蚊虫

另一个感觉器官, 可以感受环境中的温度和湿度, 并产生相应的化学变化, 起到寻找食物、血源或栖息地的目的。染色结果表明蚊虫的触角柄节 (scape) 部分细胞非常多 (图 4: a), 由此可以看出其灵敏性。

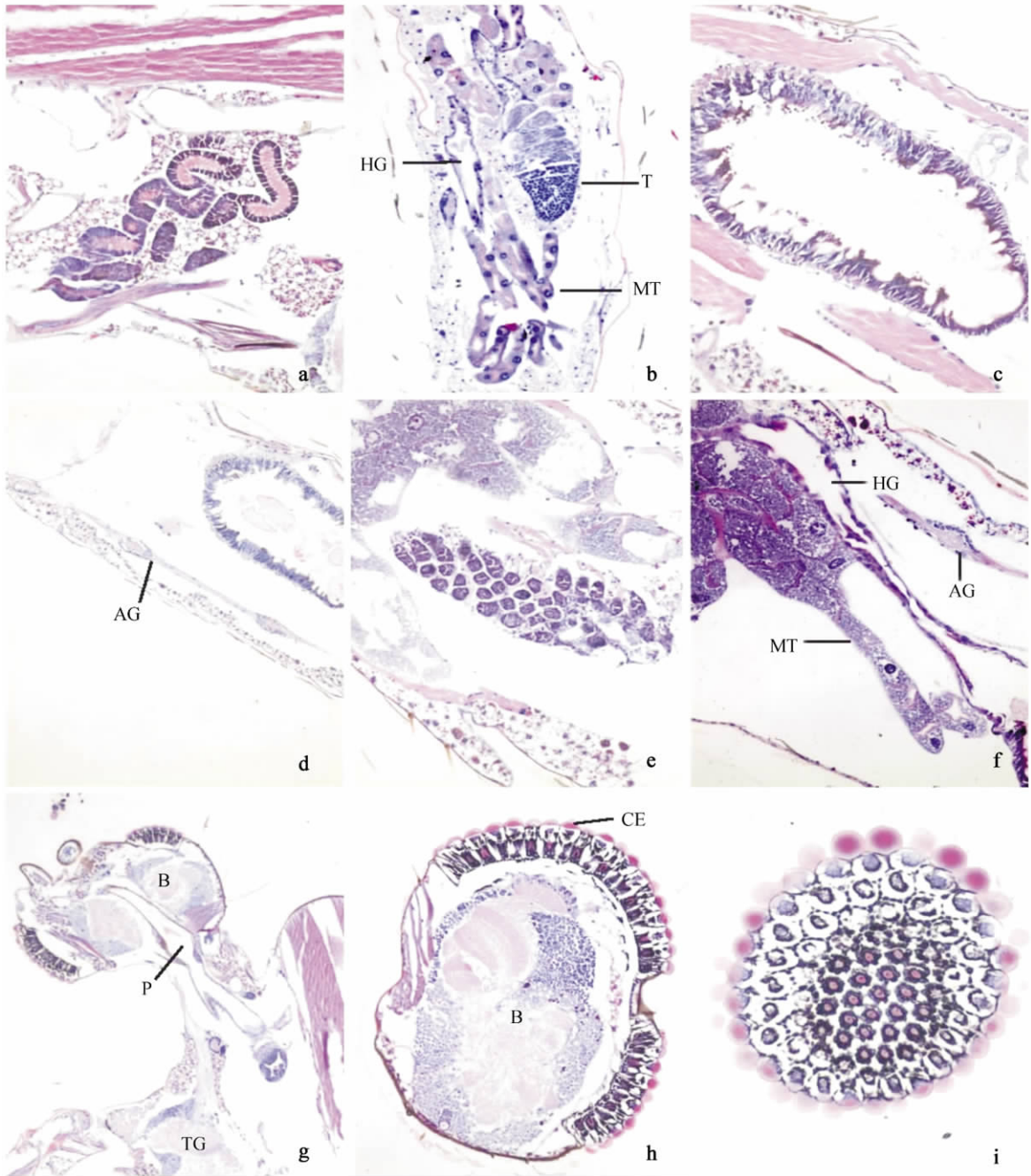


图 3 致倦库蚊不同组织的石蜡切片 ( I )

Fig. 3 Paraffin tissue sections of different organs of *Culex pipiens quinquefasciatus* adults ( I )

a: 唾液腺 Salivary glands; b: 雄性致倦库蚊的后肠、精巢与马氏管 Hindgut ,testis and Malpighian tubules of male adult; c: 中肠及其柱状上皮细胞 Midgut and columnar epithelial cells; d: 腹神经节 Abdominal ganglia; e: 卵巢 Ovary; f: 马氏管、后肠与腹神经节 Malpighian tubules ,hindgut and abdominal ganglia; g: 食管 Esophagus; h: 脑与复眼 Brain and compound eye; i: 复眼 Compound eye. AG: 腹神经节 Abdominal ganglia; E: 食管 Esophagus; B: 脑 Brain; CE: 复眼 Compound eye; HG: 后肠 Hindgut; MG: 中肠 Midgut; MT: 马氏管 Malpighian tubules; O: 卵巢 Ovary; SG: 唾液腺 Salivary glands; T: 精巢 Testis.



图4 致倦库蚊不同组织的石蜡切片( II)

Fig. 4 Paraffin tissue sections of different organs of *Culex pipiens quinquefasciatus* adults ( II)

a: 触角与咽部肌肉 Antenna and esophageal muscle; b: 后肠和直肠 Hindgut and rectum; c: 食管下神经节 Subesophageal ganglia; d: 腹支囊 Air sac; e: 脂肪体 Fat body. A: 触角 Antenna; AG: 腹神经节 Abdominal ganglia; AS: 腹支囊 Air sac; B: 脑 Brain; EM: 咽部肌肉 Esophageal muscle; FB: 脂肪体 Fat body; HG: 后肠 Hindgut; R: 直肠 Rectum; SeG: 咽下神经节 Subesophageal ganglia; TG: 胸神经节 Thoracic ganglia.

蚊虫的神经系统由脑和腹神经索组成,腹神经索(ventral nerve cord)位于消化道的下方,由一系列神经节组成,主要有咽下神经节(subesophageal ganglia)(图4: c)、胸神经节(thoracic ganglia)(图2: a; 图3: g; 图4: d)、腹神经节(abdominal ganglia)(图3: d, f)以及纵向连接各神经节的神经连索组成。HE染色结果发现,脑(图2: a, b; 图

3: g, h; 图4: c)和神经节在染色时情况相似,外表面均有蓝色颗粒状物质包围,中心为粉红色胶状物质,连接神经节之间的神经连索均被染成粉红色。另外,位于腹部最末端的神经节与腹部中部的神经节相比,形态较膨大(图4: b)。

#### 2.4 背支囊与腹支囊

蚊虫的背支囊与腹支囊组织呈管状或泡状,在

HE 染色中着色不明显,切片时很难切到完整的器官,仅见腹支囊切片(图 2; 图 4: d)。腹支囊由单层扁平细胞构成,细胞核染为淡蓝色,细胞浆为淡粉色。腹支囊与背支囊中充满气泡(图 1: b, c)。事实上,在蚊虫生命旺盛的时期,其背、腹支囊中并不能观察到成堆的气泡,随着蚊虫的衰老或在饥饿 2~3 d 的状况下,背、腹支囊才会出现如图 1(b, c) 中的情况,其中图 1(c) 中腹支囊显得细长则是由于解剖过程中过度拉伸的结果,正常状态见图 1(b)。

### 2.5 脂肪体

图 4(e) 为蚊虫体内的脂肪体组织,在染色时脂肪粒不被着色,显微镜下观察时呈白色圆形颗粒状,均匀分布于蚊虫表皮组织下方。

## 3 讨论

昆虫体壁覆盖有一层蜡质,可以防止昆虫水分过度流失,但这也导致在进行蚊虫形态固定时,虫体易漂浮在固定液的液面,而且乙醇、石蜡等也难以充分进入体内。针对这些问题,我们在固定液中加入 0.25% 的表面活性剂 Triton X-100,使虫体能够完全浸入固定液中。固定液的选择和用量、固定时的环境温度以及固定时间的长短,都是影响固定效果的关键因素。一般来说,固定液用量在虫体的 30 倍以上,固定温度越低、固定时间越短产生的形变越小,固定越均匀(王海舟等,2006)。采用 PFA 固定可以很好地保存蚊虫的 mRNA 和细胞组织结构,时间一般为 24 h 以上(黄淇和赵瑞波,2002)。本研究先在常温(25℃左右)固定 4 h,然后 4℃ 过夜固定,取得了良好的固定效果。在整个步骤中,没有进行负压处理(谢超等,2007),简化了实验过程。

由于蚊体小且较轻,为了利于后续石蜡包埋,本研究先用 2% 琼脂糖对虫体进行方位固定,这样有助于切到蚊虫身体中轴线左右的器官。同时要 HE 染色时间进行控制,才能保证组织较好的染色效果。图 2(b) 中即由于染色时间过长,导致染色过深而影响了整个细胞形态的观察。

在对蚊虫的解剖时发现,饥饿 2~3 d 的蚊虫其体内背支囊和腹支囊会充满气泡(图 1: b, c),具体原因可能是由于蚊虫在饥饿状态下生命力下降的表现。但这种方法却提供了一种观察到背支囊、腹支囊的简易方法。

本研究中许多组织的染色结果与白纹伊蚊的一致,如消化排泄系统、神经系统、生殖系统和感觉器官复眼等(谢超等,2007),但输卵管和受精囊等结构在本研究中没有能够观察到。与白纹伊蚊的组织结构研究相比,本研究提供了更为详细清晰的 HE 染色石蜡切片和内脏解剖图片,增加了对背支囊、腹支囊、脂肪体和触角等描述。这两项研究内容互补,将为利用原位杂交、免疫组化等方法研究蚊虫重要基因的功能奠定坚实的基础。

**致谢** 感谢中国科学院动物研究所的刘以训院士和高飞研究员所提供的实验条件,以及张春平对石蜡切片技术的指导。

### 参考文献 (References)

- Cui F, Tan Y, Su AF, Fu JC, Zhu Q, Qiao CL, 2005. Insecticide resistance and overproduced esterases in populations *Culex pipiens* complex of China. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 16(6): 413 - 415. [崔峰, 谭毅, 苏爱芳, 符绩超, 朱庆, 乔传令, 2005. 不同地理种群尖音库蚊复组杀虫药剂抗性及其酯酶. *中国媒介生物学及控制杂志*, 16(6): 413 - 415]
- Faran ME, Romoser WS, Routier RG, Bailey CL, 1986. Use of the avidin-biotin-peroxidase complex immunocytochemical procedure for detection of rift valley fever virus in paraffin sections of mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(5): 1061 - 1067.
- Girard YA, Klingler KA, Higgs S, 2004. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(2): 109 - 122.
- Gong MQ, Gu Y, Hu XB, Sun Y, Ma L, Li XL, Sun LX, Sun J, Qian J, Zhu CL, 2005. Cloning and overexpression of *CYP6F1*, a cytochrome P450 gene, from deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5): 317 - 326.
- Huang Q, Zhao RB, 2002. The influence of tissue fixation on *in situ* hybridization with paraffin slices mRNA. *Heilongjiang Medical Journal*, 26(7): 521. [黄淇, 赵瑞波, 2002. 组织固定对石蜡切片 mRNA 原位杂交的影响. *黑龙江医学*, 26(7): 521]
- Li CX, Zhao TY, 2006. Advance in the esterase and acetylcholinesterase genes responsible for organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes. *Acta Parasitology et Medica Entomologica Sinica*, 13(1): 51 - 56. [李春晓, 赵彤言, 2006. 蚊虫对有机磷和氨基甲酸酯抗性相关羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶基因研究进展. *寄生虫与医学昆虫学报*, 13(1): 51 - 56]
- Li X, Qiao CL, Ni XP, Kou Y, 2001. Studies on the insecticide resistances and allozyme variations of *Culex pipiens* complex mosquitoes from Hangzhou, China. *Acta Parasitology et Medica Entomologica Sinica*, 8(3): 149 - 154. [李瑄, 乔传令, 倪晓平, 寇宇, 2001. 杭州尖音库蚊复组蚊虫对杀虫剂的抗性和酯酶同工酶的研究. *寄生虫与医学昆虫学报*, 8(3): 149 - 154]

- Liu JE, Qiao CL, 2001. Molecular characterization of insecticide resistance in different populations of *Culex pipiens* complex. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 290 - 296. [刘俊娥, 乔传令, 2001. 不同地区尖音库蚊复合组抗药性的分子特征. 昆虫学报, 44(3): 290 - 296]
- Liu MD, Zhao TY, Dong YD, Lu BL, 2008. Different binding characteristics of dengue-2 virus to midgut of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43(1): 49 - 55.
- Schaefer CW, Vanderberg JP, Rhodin J, 1967. The fine structure of mosquito midgut muscle. *Journal of Cell Biology*, 34(3): 905 - 911.
- Tian HS, Zhu CL, Gao XH, Ma L, Shen B, Li XL, Wu GL, 2001. Cloning and identification of deltamethrin-resistance or susceptibility associated genes of *Culex pipiens pallens*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 19(4): 193 - 197. [田海生, 朱昌亮, 高晓红, 马磊, 沈波, 李秀兰, 吴观陵, 2001. 淡色库蚊对溴氰菊酯抗药性和敏感性相关基因克隆和序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 19(4): 193 - 197]
- Wang HZ, Wang XQ, Lv F, Cui L, Wang L, 2006. Preparation of serial paraffin slices of *Mythimna separata* Walker: preliminary research on the fixing methods of the whole larval body of oriental armyworm. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22(8): 435 - 439. [王海舟, 王小奇, 吕芳, 崔蕾, 王璐, 2006. 粘虫幼虫连续石蜡切片制备之幼虫整体固定方法初探. 中国农学通报, 22(8): 435 - 439]
- Wu ZH, Yan SG, Lin LF, Qiao CL, 2009. Resistance dynamics and genetic diversity of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from different geographical locations in China. *Acta Entomologica Sinica*, 52(5): 522 - 530. [吴中华, 燕帅国, 林立丰, 乔传令, 2009. 不同地理种群尖音库蚊复组抗性动态和遗传多样性. 昆虫学报, 52(5): 522 - 530]
- Xie C, Zhao TY, Yang FQ, Dong YD, Lu BL, 2007. Preparation and staining of serial paraffin slices of mosquitoes. *Entomological Knowledge*, 37(5): 306 - 308. [谢超, 赵彤言, 杨发青, 董言德, 陆宝麟, 2007. 蚊虫连续石蜡切片制备及染色. 昆虫知识, 37(5): 306 - 308]
- Xu JN, Qu FY, Liu WD, 1994. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes from China. *Acta Parasitology et Medica Entomologica Sinica*, 1(1): 39 - 44. [徐建农, 瞿逢伊, 刘维德, 1994. 尖音库蚊复组蚊类有机磷抗性的生化机制. 寄生虫与医学昆虫学, 1(1): 39 - 44]
- Zhang YY, Liu ZG, Sun X, Bao Y, Li M, 2007. Technique of preparation and staining of serial paraffin slices of dust mite. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(2): 294 - 296. [张莺莺, 刘志刚, 孙新, 包莹, 李盟, 2007. 尘螨连续石蜡切片的制备及染色技术. 昆虫知识, 44(2): 294 - 296]
- Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M, 2000. A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *Journal of Experimental Biology*, 203: 1599 - 1611.

(责任编辑: 袁德成)