

# 两种金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展、存活及包囊作用的影响

张忠, 叶恭银\*, 胡萃

(浙江大学应用昆虫学研究所, 杭州 310029)

**摘要:** 活体微注射测定结果表明, 将 0.5 毒囊当量(venom reservoir equivalent, VRE)的蝶蛹金小蜂毒液注射于其寄主菜粉蝶蛹体内, 注射后 4~24 h 寄主浆血细胞和颗粒血细胞的延展、存活和对 Sephadex A-50 微珠的包囊能力显著下降; 以 0.002~0.02 VRE/ $\mu$ L 的该蜂毒液处理其离体寄主血细胞均能产生同样的生理效应。该毒液抑制 90% 菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞延展的浓度各为 0.00076 VRE/ $\mu$ L 和 0.00804 VRE/ $\mu$ L。可见, 蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制其寄主血细胞的延展和包囊作用, 并导致血细胞的死亡。然而, 同样条件下丽蝇蛹集金小蜂毒液对其非自然寄主菜粉蝶蛹的血细胞延展、存活和包囊作用则无任何效应。可见, 寄生蜂毒液的生理作用具有明显的寄主特异性。

**关键词:** 蝶蛹金小蜂; 丽蝇蛹集金小蜂; 毒液; 菜粉蝶; 血细胞; 延展; 存活; 包囊作用

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)05-0551-11

## Effects of venom from two pteromalid wasps *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on the spreading, viability and encapsulation capacity of *Pieris rapae* hemocytes

ZHANG Zhong, YE Gong-Yin\*, HU Cui (Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** The effects on host hemocytes with the microinjection with venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) into its host pupae of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) *in vivo* were bioassayed. The results indicated that the venom at the dose of 0.5 venom reservoir equivalent (VRE) per host pupa was enough to significantly reduce the spreading and viability of host plasmatocytes and granular cells as well as the capability of host hemocytes to encapsulate Sephadex A-50 beads at 4 h and 24 h after injection. The same physiological effects were performed by the venom at the dose ranging from 0.002 to 0.02 VRE/ $\mu$ L as *P. rapae* hemocytes were incubated with the venom of this parasitoid *in vivo*. The concentrations of the venom to inhibit 90% plasmatocytes and granular cells of *P. rapae* were 0.00076 VRE/ $\mu$ L and 0.00804 VRE/ $\mu$ L, respectively. The medium concentrations of the venom to inhibit encapsulation capacity of *P. rapae* hemocytes *in vivo* and *in vitro* were 0.0425 VRE/pupa and 0.00007 VRE/ $\mu$ L, respectively. Thus, it is clear that *P. puparum* venom has the physiological function of markedly inhibiting the spreading and encapsulation capacity of its host hemocytes and resulting in the death of its host hemocytes. In contrast, the venom from *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae), an ectoparasitoid that does not parasitize *P. rapae* in nature, did not appear to have any effect on *P. rapae* hemocytes either *in vivo* or *in vitro* under the same conditions as that of the experiments with *P. puparum* venom. These findings suggest that the physiological effect of the venom from a defined species against insect target hemocytes has its host specificity.

**Key words:** *Pteromalus puparum*; *Nasonia vitripennis*; venom; *Pieris rapae*; hemocyte; spreading; viability; encapsulation

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170626); 浙江省青年科技人才专项基金项目(R303489)

作者简介: 张忠, 男, 1976年生, 山东济南人, 在读博士, 从事昆虫生理生化及分子生物学研究, E-mail: zzzju@sohu.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2004-03-04; 接受日期 Accepted: 2004-06-14

寄生蜂突破寄主免疫的策略有主动抑制和被动逃避两种方式(Strand and Peach, 1995)。主动抑制涉及的因子主要包括雌蜂产卵过程中分泌的毒液、多分 DNA 病毒、类病毒颗粒、卵巢蛋白,以及胚胎发育过程产生畸形细胞和幼虫分泌物等(Dahlman *et al.*, 1990; Vinson, 1990; Fleming, 1992; Asgari and Schmidt, 1994; Jones, 1996; Luckhart and Webb, 1996; Beckage, 1998; Vinson *et al.*, 1998; 叶恭银和胡萃, 1998; Kinuthia *et al.*, 1999; Shelby and Webb, 1999; 秦启联等, 2000; 尹丽红等, 2001);被动逃避过程中,寄生蜂可选择产卵于寄主血细胞不能抵达的部位或寄主组织内(Kraaijeveld and van Alphen, 1994; Eslin and Prévost, 2000),或者通过卵表面的分子拟态来逃避寄主的免疫反应(Davies and Vinson, 1986; Asgari and Schmidt, 1994; Hayakawa and Yazaki, 1997; Asgari *et al.*, 1998; Kinuthia *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2003)。就某一特定寄生蜂及其寄主而言,寄生蜂所采用的策略或涉及的主动抑制因子是因其种类而异。迄今,虽然这方面已有许多研究,但就寄生蜂类群来看主要限于姬蜂科和茧蜂科,寄生的寄主虫态主要为卵或幼虫期,而有关其他科的或蛹期寄生蜂则研究很少。为此,近年我们特选择隶属金小蜂科的蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 及其寄主菜粉蝶 *Pieris rapae* 蛹为模式系统,就该内寄生蜂如何突破其寄主免疫开展了系列研究,现已探明了该蜂寄生或假寄生(pseudoparasitism)对寄主血细胞组成与可溶性蛋白含量(蔡峻等, 2000, 2001)、体液免疫(Cai *et al.*, 2001)的影响程度,并通过假寄生初步推定该蜂毒液是其主动抑制寄主血细胞免疫的主要因子(蔡峻等, 2002)。在此基础上,我们以另一隶属金小蜂科的外寄生蜂,即丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒液为参照,通过活体微注射和离体培养处理方法,系统测定了蝶蛹金小蜂毒液对其寄主血细胞延展、存活和包裹能力的影响,以进一步考证该蜂毒液的生理功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试虫源

菜粉蝶和蝶蛹金小蜂均采自杭州市郊区,并在实验室内续代饲养。菜粉蝶成虫置室外放有盆栽甘蓝的四周覆盖 80 目尼龙纱的产卵笼(3 m × 2 m × 3 m)内产卵,卵于甘蓝叶片上孵化。幼虫仍在盆栽甘蓝上取食,3 龄时收集到人工气候室(25 ± 1℃, 14L:

10D)内继续以甘蓝叶片饲养,直至化蛹。所用甘蓝及其叶片均为移栽或采自不用任何化学农药的网室大棚内。

蝶蛹金小蜂始终饲养保育于人工气候室(25 ± 1℃, 14L: 10D)内。羽化后,按 1:2 的雌雄比转移至附有一个蘸透 20% 蜂蜜水的脱脂棉球的“子弹型”大玻管中,管口扎以纱布,任其取食、交配,2 天后用于接蜂。接蜂时,先把化蛹 12 h 内的菜粉蝶蛹放入 1.8 cm × 8.2 cm 的指形管内,每管 1 头,然后接入羽化后 2 天且已集中交配过的雌蜂 1 头,以棉花塞口,观察并标记被寄生的蛹,待子蜂羽化。收集雌成蜂,供毒液提取用。

丽蝇蛹集金小蜂自室外诱集而得,以棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* 为寄主繁育。将室内饲养的化蛹 3 天内的棕尾别麻蝇蛹收集于 500 mL 的玻璃罐头瓶中,每瓶 50 头左右,移入集中交配过的丽蝇蛹集金小蜂 30 头,寄生 24 h 后,去除寄生蜂,被寄生的蝇蛹置上述同样的人工气候室内保育,待子蜂羽化。寄生后约 2 周左右收集羽化的雌成蜂,供毒液提取用。

### 1.2 毒液提取

参照 Richard 和 Parkinson(2000)方法,将羽化后 3 天的雌蜂置 Olympus 解剖镜下,用尖嘴镊拉出其毒腺,取下毒囊移至冰浴的含有一定体积 TBS 缓冲液(50 mmol/L Tris, 307 mmol/L NaCl, 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.4)的 Eppendorf 离心管中。冰浴中研磨后,置 4℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得毒液粗提液。然后,以 TBS 缓冲液调节毒液浓度,使每 2 μL TBS 缓冲液中所含毒液量分别相当于 0.5、1、2、4 和 5 个毒囊,并各记作 0.5、1、2、4 和 5 毒囊当量(venom reservoir equivalent, VER)。最后,置 -70℃ 保存备用或立即用于实验。

### 1.3 毒液对寄主血细胞延展和存活影响的测定

**1.3.1 活体血细胞:**以 Eppendorf 显微注射器将 2 μL 含 0.5 VRE 的毒液分别单头微注射于化蛹后 1 天的 30 头菜粉蝶蛹内,并置 27℃ 细胞培养箱内保育。设注射 2 μL TBS 缓冲液为对照。于注射后 4 h 和 24 h,取 10 μL 血淋巴于 Nikon 倒置显微镜下观察统计延展和未延展的浆血细胞和颗粒血细胞的数量,浆血细胞变为梭形或其他不规则形状计数为延展,颗粒血细胞以细胞伸出伪足计数为延展,两种细胞均以圆形计数为非延展,浆血细胞和颗粒血细胞的区分参照 Gupta(1979)的标准;另取 10 μL 血淋巴与等体积 0.04% 的台盼蓝(trypsin blue)溶液(台盼蓝

0.04 g 溶于 100 mL 生理盐水中)混匀,10 min 后以血球计数板于 Olympus 相差显微镜下观察统计染成蓝色(死亡)和未被染色(存活)的浆血细胞和颗粒血细胞的数量,计算血细胞存活率。

**1.3.2 离体血细胞:**用 75% 酒精消毒化蛹后 1 天的菜粉蝶蛹体表,于无菌操作台内采集血淋巴,置于含少量苯基硫脲的 Eppendorf 离心管中,再各取 50  $\mu\text{L}$  分别加到每孔含 200  $\mu\text{L}$  的 TC100 昆虫细胞培养液(含 10% 胎牛血清)的 48 孔细胞培养板的各孔穴中。然后,将不同浓度的毒液提取液按 2  $\mu\text{L}$  的量分别加入 3 个不同孔穴中,使有关孔穴中毒液剂量分别调至为 0.002、0.004、0.008、0.016 和 0.02 VRE/ $\mu\text{L}$ 。设仅加 2  $\mu\text{L}$  TBS 缓冲液为对照。接着,置 27 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养,并分别于 4 h 和 24 h 后置 Nikon 倒置显微镜下任选 3 个视野观察统计各处理孔穴中延展和未延展的浆血细胞和颗粒血细胞的数量,并计算 2 种血细胞的延展率和延展抑制率。延展率(%) = 延展的某种血细胞数量/该种血细胞的总数量  $\times 100$ ; 延展抑制率(%) = (对照组某种血细胞的延展率 - 某剂量毒液处理后该种血细胞延展率)/对照组该种血细胞的延展率  $\times 100$ 。同时,以 Eppendorf 微量移液器吸出各处理孔穴中的血细胞悬浮液,加等体积的 0.04% 台盼蓝溶液混匀,按 1.3.1 节方法观察浆血细胞和颗粒血细胞的存活情况。

#### 1.4 毒液对寄主血细胞包囊作用影响的测定

**1.4.1 活体血细胞:**分别在含 0.5、1、2、4 和 5 VRE 的 2  $\mu\text{L}$  毒液粗提液中加入 Sephadex A-50 微珠,使微珠含量为 5 粒/ $\mu\text{L}$ 。再参照 1.3.1 节方法分别将含不同毒囊当量的微珠-毒液混合物微注射于菜粉蝶蛹体内,每处理注射 10 头。同时设注射含 5 粒/ $\mu\text{L}$  Sephadex A-50 珠的 TBS 缓冲液为对照。注射后 4 h 和 24 h 自各处理分别取 5 头蛹解剖,置 Leica 倒置显微镜下观察统计 Sephadex A-50 微珠被包囊的程度及不同包囊程度的微珠个数。根据 Sephadex A-50 微珠表面覆盖的血细胞量及包囊层厚度,将包囊程度分为 5 级(详见图 5 所示)。按照不同包囊级别的微珠个数,计算各处理的包囊指数和包囊抑制率。包囊指数(%) =  $[\sum(\text{某一包囊级数} \times \text{该包囊级别的 Sephadex A-50 微珠数目}) / (\text{Sephadex A-50 微珠的总数} \times 5)] \times 100$ 。包囊抑制率(%) = (对照组包囊指数 - 处理组包囊指数)/对照组包囊指数  $\times 100$ 。每处理均重复 3 次。

**1.4.2 离体血细胞:**参照 1.3.2 节方法将菜粉蝶蛹血细胞加入含 TC100 昆虫细胞培养液的 48 孔细胞

培养板孔穴中;再将不同浓度的毒液提取液按 2  $\mu\text{L}$  的量分别加入 3 个不同孔穴中,使有关孔穴中毒液剂量分别调至为 0.002、0.004、0.008、0.016 和 0.02 VRE/ $\mu\text{L}$ ;最后在每个孔穴中加入 10 粒 Sephadex A-50 微珠,置 27 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培育。同时设加 2  $\mu\text{L}$  TBS 和 10 粒 Sephadex A-50 微珠的作对照。培养、处理 4 h 和 24 h 后,参照 1.4.1 节方法置 Leica 倒置显微镜下观察统计各处理孔穴中不同包囊级别的 Sephadex A-50 微珠粒数,计算包囊指数和包囊抑制率。

## 2 结果与分析

### 2.1 毒液对寄主血细胞延展和存活的影响

**2.1.1 活体血细胞:**蝶蛹金小蜂毒液能明显抑制其寄主菜粉蝶蛹血细胞延展,并明显导致血细胞死亡。当将 0.5 VRE 的毒液微注射于寄主体内 4 h 和 24 h 后,寄主浆血细胞( $F = 130.394$ ,  $P < 10^{-4}$ )和颗粒血细胞( $F = 869.411$ ,  $P < 10^{-4}$ )的延展率,以及颗粒血细胞存活率均显著低于对照( $F = 27.59$ ,  $P = 0.0004$ )(图 1: A, B, D),浆血细胞的存活率于注射后 24 h 也显著低于对照( $F = 32.628$ ,  $P = 0.005$ )(图 1: C)。然而,丽蝇蛹集金小蜂毒液对其非自然寄主菜粉蝶蛹浆血细胞( $F = 0.028$ ,  $P = 0.871$ )和颗粒血细胞( $F = 0.331$ ,  $P = 0.578$ )的延展,及浆血细胞( $F = 0.029$ ,  $P = 0.868$ )和颗粒血细胞( $F = 1.244$ ,  $P = 0.291$ )的存活则均无显著影响(图 1: A ~ D)。

**2.1.2 离体血细胞:**离体培养条件下,菜粉蝶蛹浆血细胞和颗粒血细胞未经其自然寄生蜂蝶蛹金小蜂毒液处理(图 2: A ~ C)或经其非自然寄生蜂丽蝇蛹集金小蜂毒液处理时则均能正常延展,并形成伪足(图 2: D),而经 0.002 ~ 0.02 VRE/ $\mu\text{L}$  的蝶蛹金小蜂毒液处理后则明显受到抑制(图 2: E)。

就毒液对寄主浆血细胞和颗粒血细胞延展率影响而言,当以 0.002 ~ 0.02 VRE/ $\mu\text{L}$  的蝶蛹金小蜂毒液处理时,其寄主菜粉蝶蛹中这两种血细胞的延展率不论在处理 4 h 还是 24 h,均小于 20%,其中高毒囊当量处理的似更低,而仅加 TBS 缓冲液的对照中两者延展率均大于 90%(图 3: A ~ D)。统计表明,蝶蛹金小蜂毒液对其寄主浆血细胞( $F = 2660.208$ ,  $P < 10^{-4}$ )和颗粒血细胞( $F = 1243.715$ ,  $P < 10^{-4}$ )延展均有显著抑制作用;毒液剂量对浆血细胞( $F = 7.099$ ,  $P = 0.0010$ )和颗粒血细胞( $F =$

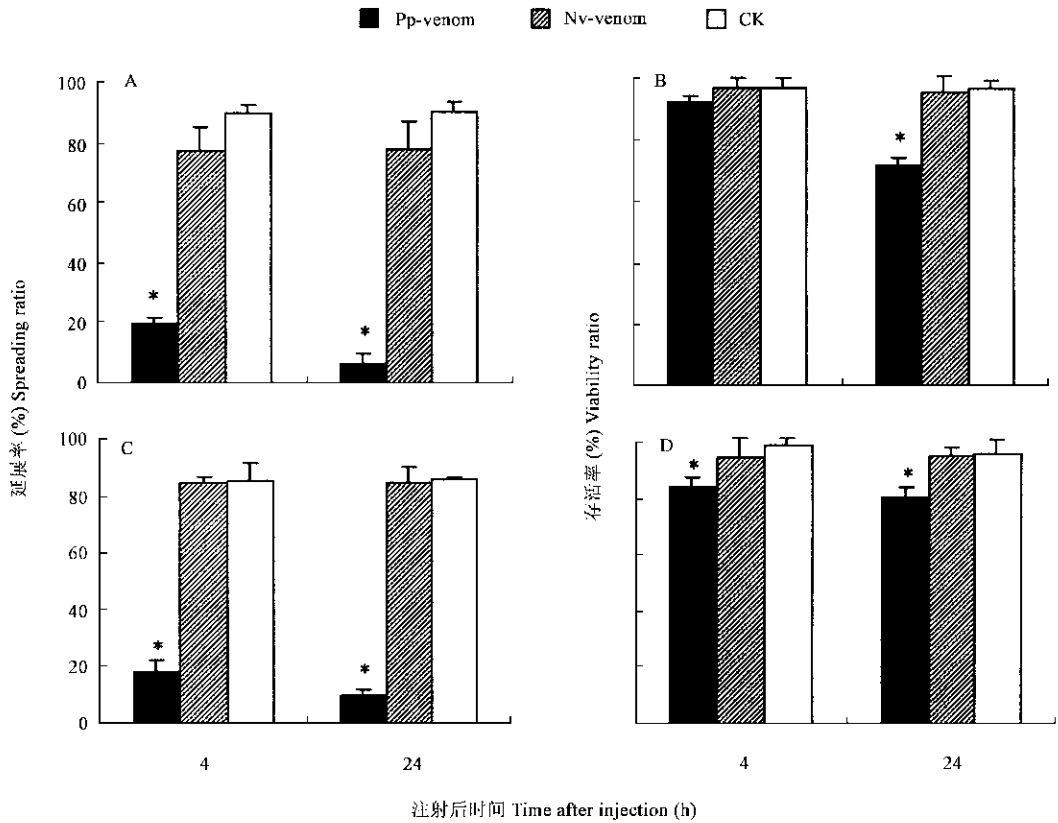


图 1 两种金小蜂毒液对活体菜粉蝶蛹血细胞延展和存活的影响

Fig. 1 Effects of venom from two species of pteromalid wasps on the spreading and viability of hemocytes of *Pieris rapae* pupae in vivo

A, C: 浆血细胞 Plasmatocytes; B, D: 颗粒血细胞 Granular cells. Pp-venom: 蝶蛹金小蜂毒液处理 Treatment with *P. puparum* venom; Nv-venom: 丽蝇蛹集金小蜂毒液处理 Treatment with *N. vitripennis* venom; CK: TBS 缓冲液代替毒液 Treatment with Tris buffer solution (TBS) instead of venom; \* 表示与对照差异达显著水平 ( $P < 0.05$ , Student's *t*-检验) Showing significant difference from the control at  $P < 0.05$  (Student's *t*-test); 图 3、图 5、图 7 和图 8 同 The same for Fig. 3, 5, 7 and 8.

8.333,  $P = 0.0004$ ) 延展具显著影响; 但处理时间对浆血细胞 ( $F = 1.597$ ,  $P = 0.2209$ ) 和颗粒血细胞 ( $F = 0.613$ ,  $P = 0.4428$ ) 的延展则无显著影响 (图 3: A ~ D)。蝶蛹金小蜂毒液浓度对浆血细胞 ( $F = 8.940$ ,  $P = 0.0001$ ) 和颗粒血细胞 ( $F = 9.358$ ,  $P = 0.0001$ ) 延展抑制率也有显著影响, 其中抑制率随毒液浓度而呈线性增高 (图 4)。毒液对寄主浆血细胞和颗粒血细胞延展抑制率的机率值 ( $y$ ) 与其浓度 ( $x$ ) 的线性回归方程各为:  $y = 7.7068 + 0.4567x$  ( $r = 0.7306$ ,  $F = 32.0565$ ,  $P < 10^{-4}$ ) 和  $y = 7.152 + 0.4155x$  ( $r = 0.7442$ ,  $F = 34.7633$ ,  $P < 10^{-4}$ ); 抑制 90% 浆血细胞和颗粒血细胞延展的蝶蛹金小蜂毒液浓度分别为 0.00076 VRE/ $\mu\text{L}$  (0.0001 ~ 0.0027) 和 0.00804 VRE/ $\mu\text{L}$  (0.00028 ~ 0.03349)。然而, 当以丽蝇蛹集金小蜂毒液处理时, 菜粉蝶蛹浆血细胞 ( $F = 1.501$ ,  $P = 0.219$ ) 和颗粒血细胞 ( $F = 0.179$ ,  $P =$

0.968) 的延展率均未受到影响; 在不同毒液剂量和不同处理时间的各组合中, 这两种血细胞延展率与仅加 TBS 缓冲液的对照相比均无显著差异 (图 3: A ~ D), 可见, 丽蝇蛹集金小蜂毒液对其非自然寄主的血细胞延展无任何抑制作用。

蝶蛹金小蜂毒液还可显著影响菜粉蝶蛹浆血细胞 ( $F = 23.784$ ,  $P < 10^{-4}$ ) 和颗粒血细胞 ( $F = 18.267$ ,  $P = 0.0001$ ) 的存活。毒液处理后, 离体的浆血细胞的存活率随处理时间延长 ( $F = 31.523$ ,  $P < 10^{-4}$ ) 和毒液浓度增加 ( $F = 7.439$ ,  $P = 0.0008$ ) 显著降低, 而处理时间 ( $F = 4.037$ ,  $P = 0.0582$ ) 和毒液浓度 ( $F = 2.591$ ,  $P = 0.0679$ ) 对颗粒血细胞的存活均无显著影响 (图 5: A ~ D)。但以丽蝇蛹集金小蜂毒液处理后, 菜粉蝶蛹浆血细胞 ( $F = 0.061$ ,  $P = 0.997$ ) 和颗粒血细胞 ( $F = 0.065$ ,  $P = 0.997$ ) 的存活率与仅加 TBS 缓冲液的对照相比则均无显著差异

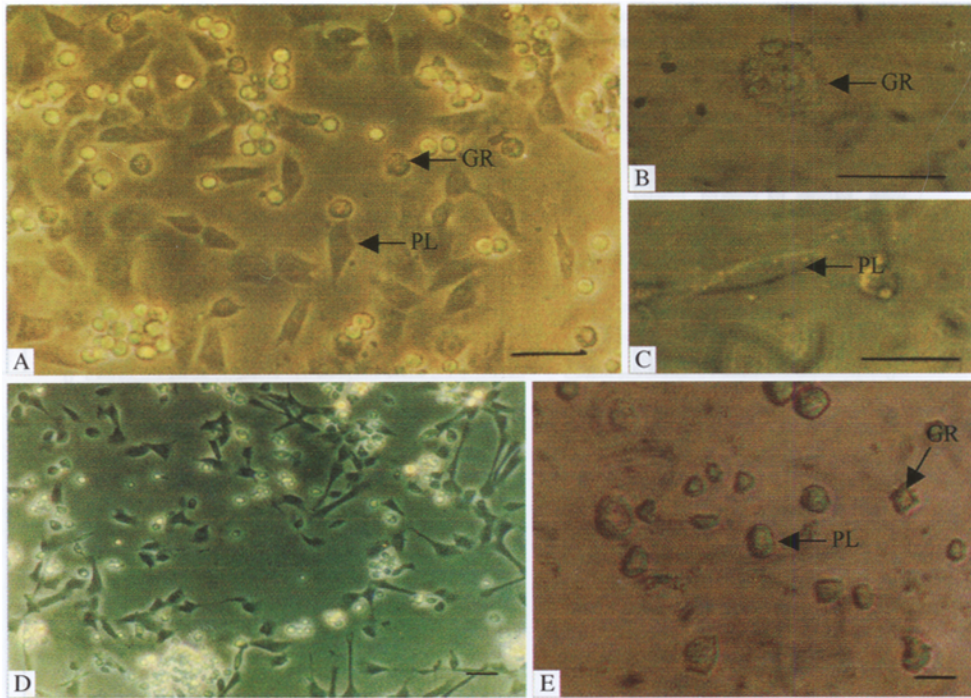


图 2 离体培养菜粉蝶蛹血细胞的形态及其经两种金小蜂毒液处理后的变化

Fig. 2 The micrographs of *P. rapae* pupae hemocytes *in vitro* and their changes after treatment with venom from two species of pteromalid wasps

A: 正常血细胞 Normal hemocytes; B: 延展颗粒血细胞 Spreading granular cells; C: 延展浆血细胞 Spreading plasmotocytes; D: 丽蝇蛹集金小蜂毒液处理 Hemocytes treated with *N. vitripennis* venom; E: 蝶蛹金小蜂毒液处理 Hemocytes treated with *P. puparum* venom; PL: 浆血细胞 Plasmotocytes; GR: 颗粒血细胞 Granular cells. 标尺 Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

(图 5:A~D), 可见, 丽蝇蛹集金小蜂毒液对其非自然寄主的血细胞存活无任何负作用。

## 2.2 毒液对寄主血细胞包裹作用的影响

不论在活体还是离体条件下, 菜粉蝶蛹血细胞对异物 Sephadex A-50 微珠均能产生包裹反应, 包裹的程度可依据 Sephadex A-50 微珠表面覆盖的血细胞量及包裹层厚度分成 5 级, 其中, 1 级: 微珠表面仅有少数血细胞 (< 10 个); 2 级: 微珠未被血细胞完全包裹; 3 级: 微珠恰好被血细胞完全包裹; 4 级: 血细胞完全包裹微珠, 但包裹层厚度小于微珠半径; 5 级: 血细胞完全包裹微珠, 且包裹层厚度大于微珠半径(图 6:A~E)。

活体测定结果表明, 蝶蛹金小蜂毒液可显著抑制菜粉蝶蛹血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹作用( $F = 1\,922.006$ ,  $P < 10^{-4}$ )。当将 0.5~5 VRE 的蝶蛹金小蜂毒液微注射于其寄主菜粉蝶蛹体内时, 其血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹指数显著低于仅加 TBS 缓冲液的对照( $F = 1\,239.088$ ,  $P < 10^{-4}$ )(图 7)。可见, 蝶蛹金小蜂毒液对其寄主血细胞包裹反应呈现显著抑制作用。活体注射结果表

明, 注射毒液剂量对寄主血细胞包裹 Sephadex A-50 的指数具显著影响( $F = 4.033$ ,  $P = 0.0148$ ), 并随注射剂量提高而下降; 而注射后时间对此则无显著影响( $F = 4.294$ ,  $P = 0.0514$ ); 注射剂量( $F = 9.915$ ,  $P = 0.0001$ )和注射后时间( $F = 20.330$ ,  $P = 0.0002$ )对包裹抑制率均有显著影响, 其中包裹抑制率随注射剂量的增高而升高(图 9:A)。离体测定结果也表明, 蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制菜粉蝶蛹血细胞对 Sephadex A-50 微珠体外包裹( $F = 1\,922.006$ ,  $P < 10^{-4}$ )。当以 0.002~0.02 VRE/ $\mu\text{L}$  的毒液处理其离体菜粉蝶蛹血细胞时, 血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹指数于处理 4 h 和 24 h 后均显著低于仅加 TBS 缓冲液的对照(图 8); 毒液浓度( $F = 143.761$ ,  $P = 0.0001$ )和处理时间( $F = 11.727$ ,  $P = 0.0267$ )能显著影响血细胞对 Sephadex A-50 的包裹能力, 其中血细胞对 Sephadex A-50 的指数随毒液浓度的提高而降低(图 8)。毒液浓度对血细胞包裹抑制率有显著影响( $F = 13.807$ ,  $P < 10^{-4}$ )(图 9:B), 而处理时间则没有显著影响( $F = 2.806$ ,  $P = 0.1043$ )。然而, 当以丽蝇蛹集金小蜂毒液处理时, 不论在活体( $F = 1.612$ ,  $P =$

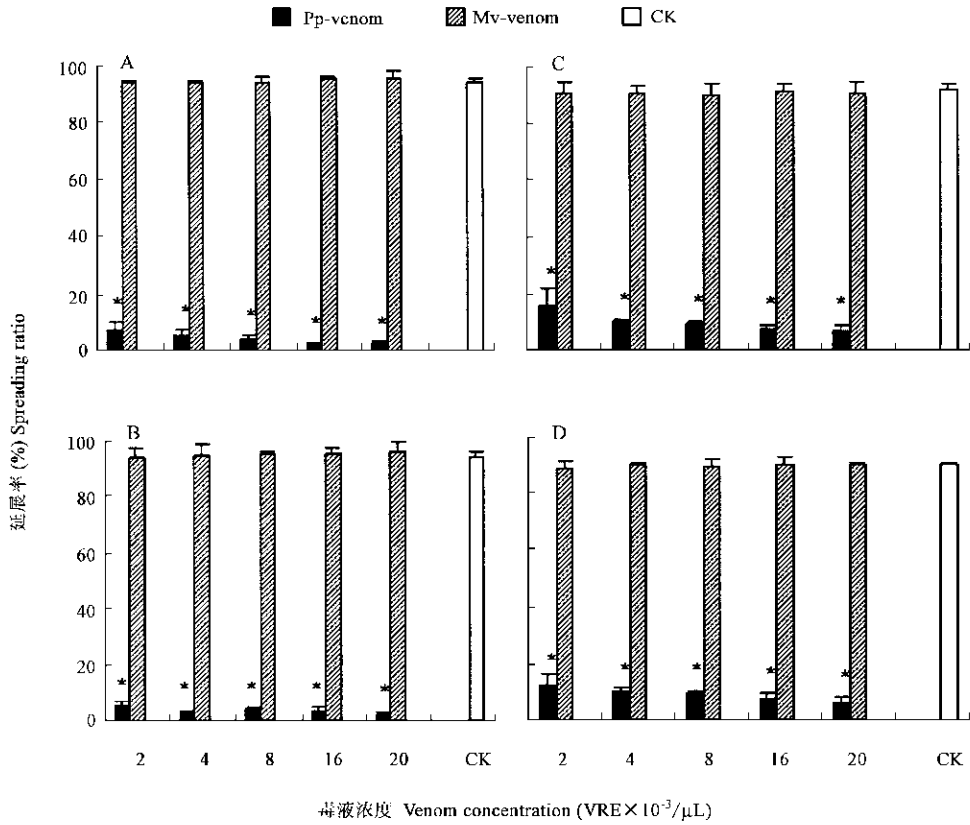


图3 两种金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹血细胞延展的影响

Fig. 3 Effects of venom from two species of pteromalid wasps on the hemocyte spreading of *P. rapae* pupae *in vitro*

A, B: 处理后 4 h 和 24 h 的浆血细胞 Plasmacytes at 4 h and 24 h after treatment; C, D: 处理后 4 h 和 24 h 的颗粒血细胞 Granular cells at 4 h and 24 h after treatment. 图 5 同 The same for Fig. 5.

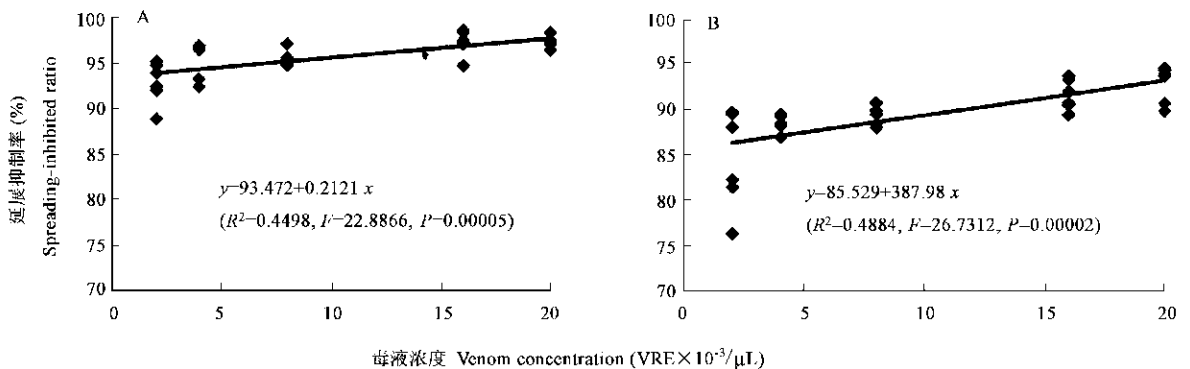


图4 菜粉蝶蛹离体浆血细胞(A)和颗粒血细胞(B)延展抑制率与蝶蛹金小蜂毒液浓度的关系

Fig. 4 Correlation between the spreading-inhibited ratio of plasmacytes (A) and granular cells (B) from *P. rapae* pupae *in vitro* and the concentration of *P. puparum* venom

0.1873) 还是离体 ( $F = 1.039$ ,  $P = 0.4132$ ) 条件下菜粉蝶蛹血细胞对 Sephadex A-50 微珠的包裹指数均未受到显著影响。毒液处理 4 h 和 24 h 后, 各处理组合的

包裹指数与仅加 TBS 缓冲液的对照相比均无显著差异(图 7, 图 8)。可见, 该寄生蜂毒液对其非自然寄主的血细胞包裹反应无任何作用。

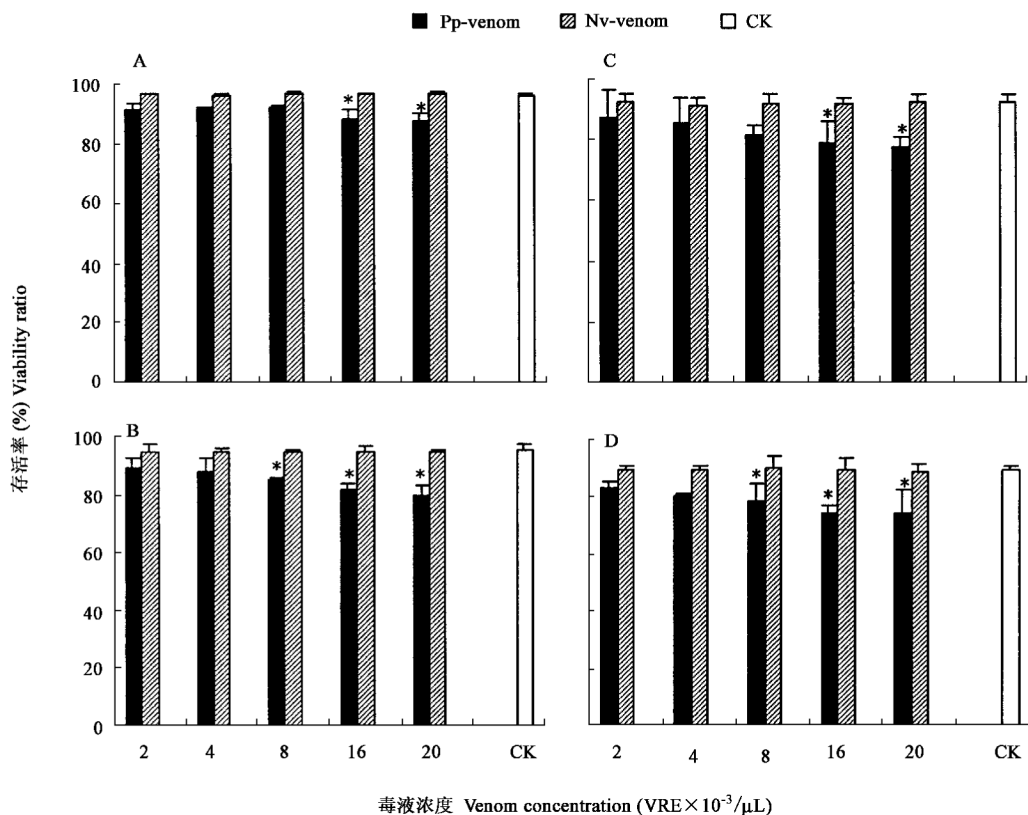


图 5 两种金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹血细胞存活的影响

Fig. 5 Effects of venom from two species of pteromalid wasps on the hemocyte viability of *P. rapae* pupae *in vitro*

### 3 讨论

本研究结果表明,将蝶蛹金小蜂毒液微注射于寄主活体或用以处理离体培养寄主血细胞,均能显著影响寄主浆血细胞和颗粒血细胞的存活,抑制80%甚至90%以上的寄主浆血细胞和颗粒血细胞的延展,抑制血细胞包裹作用。综合分析我们前期(蔡峻等, 2000, 2001, 2002)和本研究结果,可认为该蜂毒液在抑制其寄主血细胞免疫中起着主导作用。该蜂毒液的这种生理功能,与番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 蛹期内寄生蜂瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca*, 及麻蝇 *Sarcophaga bullata* 的蛹期外寄生蜂丽蝇集金小蜂的毒液功能相似。其中,瘤姬蜂的毒液不仅能抑制寄主蛹血细胞包裹作用(Marris *et al.*, 1999; Parkinson *et al.*, 2002),而且也能抑制寄主6龄幼虫血细胞包裹作用和吞噬作用,导致血细胞形态变化(肿胀、脱粒化或产生空泡)或死亡(Richards and Parkinson, 2000),但在其生殖道中不存在多分DNA病毒(Richards and Parkinson, 2000);丽

蝇集金小蜂毒液能象自然寄生一样通过抑制浆血细胞和颗粒血细胞的延展,及导致这两种血细胞死亡,以突破寄主的血细胞免疫(Rivers *et al.*, 2002)。但是,在其他有关寄生蜂研究中,毒液生理功能并不象上述3种蛹期寄生蜂一样,特别是在那些具多分DNA病毒的类群中它们在影响寄主细胞免疫中的作用是相当有限的(Beckage, 1998)。例如,在具有多分DNA病毒的某些茧蜂中,该病毒在抑制寄主幼虫细胞免疫中起关键作用,而毒液仅起增效作用(Kitano, 1986; Guzo and Stoltz, 1987; Tanaka, 1987a, 1987b; Wago and Tanaka, 1989),其增效的机理可能是促进PDV病毒侵入寄主细胞(Stoltz *et al.*, 1988; Strand and Dover, 1991; Strand and Noda, 1991; Strand *et al.*, 1992)。又如,Webb和Luhart(1996)证实,具多分DNA病毒的索诺拉毁蠹姬蜂 *Camponotus sonorensis* 的毒液在抑制寄主烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 幼虫血细胞免疫中没有作用,摘除毒囊的雌蜂所产卵仍能在寄主体内正常发育。再如,姬小蜂 *Eulophus pennicornis* 外寄生番茄夜蛾5龄幼虫,能抑制其寄主血细胞对异物识别与吞噬作用,抑制浆血

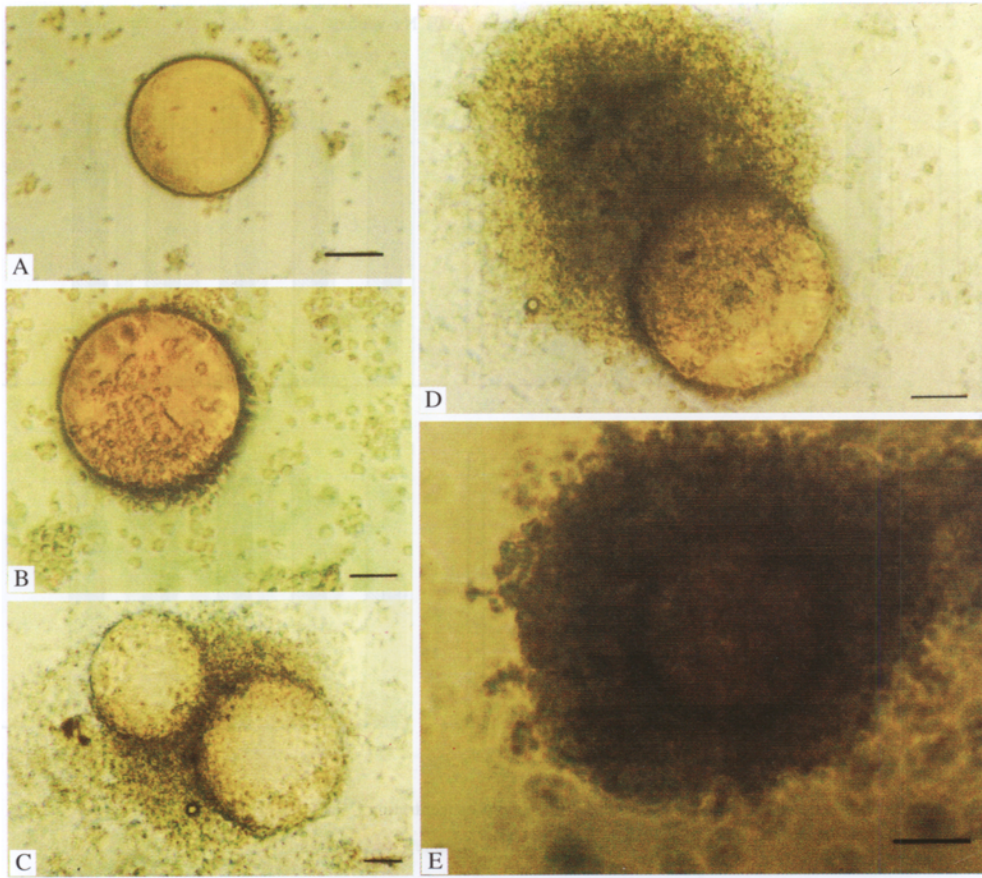


图 6 不同包裹级别的 Sphadex A-50 微珠-菜粉蝶血细胞复合体的显微形态  
 Fig. 6 The micrographs of the complex of Sphadex A-50 beads and *P. rapae* hemocytes with different encapsulated grades

A ~ E 分别表示 1, 2, 3, 4 和 5 包裹级别 Showing the complex of beads and hemocytes with the encapsulated grade of 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. 标尺 Scale bar = 10 μm.

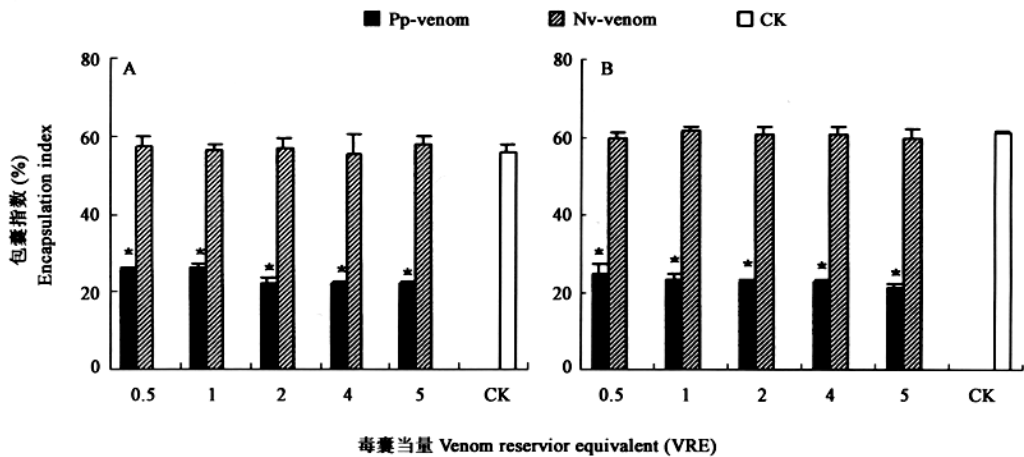


图 7 两种金小蜂毒液对活体菜粉蝶蛹血细胞包裹作用的影响  
 Fig. 7 Effects of venom from two species of pteromalid wasps on the encapsulation capacity of *P. rapae* pupae hemocytes *in vivo*

A, B: 注射后 4 h 和 24 h 血细胞对 Sphadex A-50 微珠的包裹作用 The encapsulation of Sphadex A-50 beads by hemocytes *in vivo* at 4 h and 24 h after venom injection; 图 8 同 The same for Fig. 8.



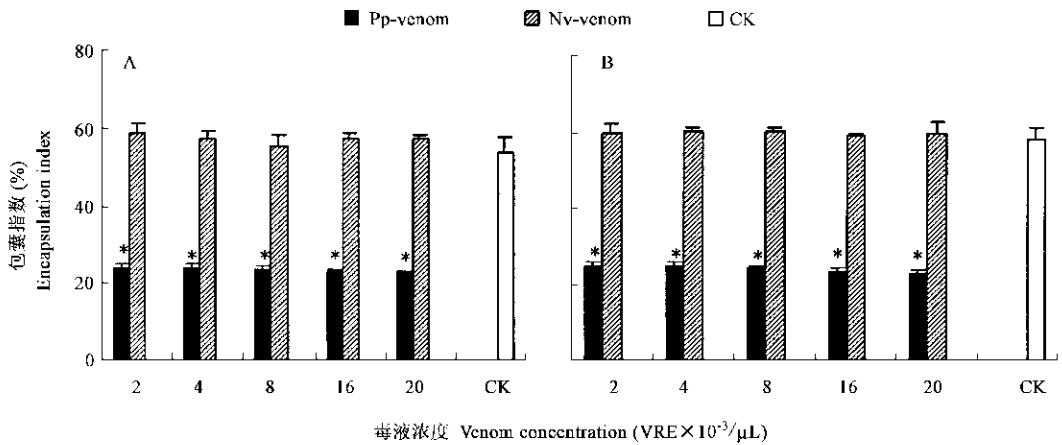


图 8 两种金小蜂毒液对离体菜粉蝶蛹血细胞包囊作用的影响

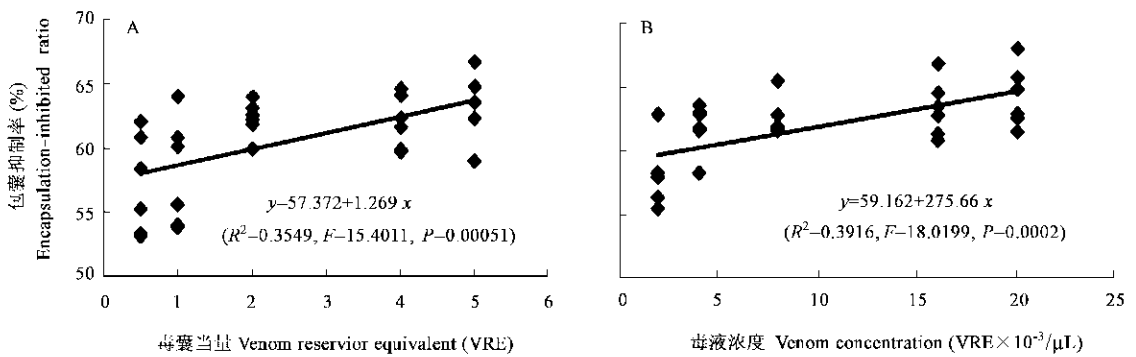
Fig. 8 Effects of venom from two species of pteromalid wasps on the encapsulation capacity of *P. rapae* pupae hemocytes in vitro

图 9 活体(A)和离体(B)菜粉蝶蛹血细胞对 Sephadex A-50 微粒包囊的抑制率与蝶蛹金小蜂毒液浓度的关系

Fig. 9 Correlation between the ratio of hemocytes of *P. rapae* pupae being inhibited to encapsulate Sephadex A-50 beads in vivo (A) and in vitro (B) and the dose of *P. puparum* venom

细胞和颗粒血细胞延展,导致这两种血细胞死亡率上升,但仅注射其毒液时却不能引起相同的生理效应,即毒液在影响寄主血细胞免疫中并未发挥作用(Richards and Edwards, 1999, 2000)。综上所述,寄生蜂毒液的生理功能因寄生蜂类群及其寄生的寄主虫态而异,这可能是寄生蜂与寄主间协同进化的结果。因此,我们在研究寄生蜂突破寄主免疫机理时应因所研究的寄生蜂-寄主体系而全面评价有关寄生蜂抑制寄主免疫有关因子的单独作用及各因子的相互关系,进而再综合分析、评判其中的关键因子。

蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制其自然寄主菜粉蝶蛹的血细胞免疫,但与蝶蛹金小蜂同隶属金小蜂科的丽蝇蛹集金小蜂的毒液虽能明显抑制其自然寄主麻蝇的血细胞免疫(Rivers *et al.*, 2002),却对其非

自然寄主菜粉蝶蛹血细胞免疫则无任何作用。这与具外寄生性的啮小蜂 *Melittobia digitata* 毒液对其非自然寄主麻蝇离体浆血细胞和颗粒血细胞存活、粘着、延展以及形态无任何作用(Rivers *et al.*, 2002)的结果相似。可见,寄生蜂毒液抑制寄主免疫具有寄主的种特异性,这也可能就是某种特定寄生蜂均具有其特定寄主范围的原因所在。

昆虫在识别、吞噬或包囊异物的过程中,可能与其浆血细胞和颗粒血细胞表面或释放的某些因子有关。Franchini 等(1996)研究表明,在反吐丽蝇 *Calliphora vomitoria* 中参与吞噬作用或包囊反应的浆血细胞和颗粒血细胞具有与脊椎动物单核细胞和无脊椎动物血细胞化学诱导物(chemo-attractant)——促肾上腺激素(ACTH)和  $\alpha$ -肿瘤坏死分子( $\alpha$ -TNF)类

似的免疫反应性物质(Hughes *et al.*, 1990; Genedani *et al.*, 1994; Ottaviani *et al.*, 1995)。Rivers 等(2002)推测在麻蝇血细胞中也有类似情况,故丽蝇蛹集金小蜂毒液要抑制其寄主血细胞免疫,首先须特异性地作用于在识别异物、血细胞聚集过程中起关键作用的浆血细胞,抑制浆血细胞化学诱导物的激活。而蝶蛹金小蜂毒液作用于其寄主浆血细胞和颗粒血细胞是否有类似情况尚不明确,有待深入研究。此外,我们仅探讨了蝶蛹金小蜂毒液粗提液的生理功能,但究竟是毒液中何种组分还是几种组分共同作用的结果尚不明了,有待在纯化毒液各组分的基础上做进一步的研究。

### 参考文献 (References)

- Asgari S, Schmidt O, 1994. Passive protein of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula* in the host, *Pieris rapae*. *J. Insect Physiol.*, 40: 789 - 795.
- Asgari S, Theopold U, Welby C, Schmidt O, 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 3 690 - 3 695.
- Beckage NE, 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. *Parasitology*, 116 (S): 57 - 64.
- Cai J, Lu HP, Ye GY, Hu C, 2001. Effects of pseudoparasitism on total hemocyte count and cellular encapsulation of *Pieris rapae* pupae. *J. Zhejiang Univ. (Agric. Life Sci.)*, 27 (1): 15 - 18. [蔡峻, 吕慧平, 叶恭银, 胡萃, 2001. 假寄生对菜粉蝶蛹血细胞总数和包裹能力的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 27 (1): 15 - 18]
- Cai J, Lu HP, Ye GY, Hu C, 2002. A simple and easy method for rapidly evaluating the physiological activities of some casual factors from the adult females of endoparasitoids. *Acta Phytomycol Sinica*, 29 (1): 25 - 30. [蔡峻, 吕慧平, 叶恭银, 胡萃, 2002. 快速评价内寄生蜂雌蜂携带因子生理活性的简易方法. 植物保护学报, 29 (1): 25 - 30]
- Cai J, Ye GY, Hu C, 2000. Effect of parasitism on hemocyte population and soluble protein components in the hemolymph of *Pieris rapae* pupae. *Acta Phytomycol Sinica*, 27 (2): 151 - 156. [蔡峻, 叶恭银, 胡萃, 2000. 寄生对菜粉蝶蛹血淋巴中血细胞和可溶性蛋白组份的影响. 植物保护学报, 27 (2): 151 - 156]
- Cai J, Ye GY, Hu C, 2001. Effect of parasitization by the pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) on humoral immune reactions of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Entomologia Sinica*, 8 (4): 335 - 342.
- Dahlman DL, Coar DL, Koller CN, Neary TJ, 1990. Contributing factors to reduced ecdysteroid titers in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 13: 29 - 39.
- Davies D, Vinson SB, 1986. Passive evasion by eggs of the braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* from encapsulation *in vitro* by hemocytes of host *Heliothis virescens*. *J. Insect Physiol.*, 32: 1 003 - 1 010.
- Eslin P, Prévost G, 2000. Racing against host's immunity defenses: a likely strategy from passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. *J. Insect Physiol.*, 46: 1 161 - 1 167.
- Fleming JGW, 1992. Polydnaviruses: mutualism and pathogens. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 401 - 451.
- Franchini A, Miyan JA, Ottaviani E, 1996. Induction of ACTH and TNF- $\alpha$ -like molecules in the hemocytes of *Calliphora vomitoria* (Insecta: Diptera). *Tissue and Cell*, 28: 587 - 592.
- Genedani S, Bernardi M, Ottaviani E, Franceschi C, Leung MK, Stefano GB, 1994. Differential modulation of invertebrate immunocyte motility by CRF, ACTH, and its fragments. *Peptides*, 15: 203 - 206.
- Gupta AP, 1979. *Insect Hemocytes*. Cambridge: Cambridge University Press. 525 - 527.
- Guzo D, Stoltz DB, 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in tussock moth. *J. Insect Physiol.*, 33: 19 - 31.
- Hayakawa Y, Yazaki K, 1997. Envelope protein of wasp PDV protects wasp eggs from cellular immune reactions of host. *Europ. J. Biochem.*, 246: 820 - 826.
- Hu J, Zhu XX, Fu WJ, 2003. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect Physiol.*, 49: 367 - 375.
- Hughes TK, Smith EM, Chin R, Cadet P, Sinisterra J, Leung MK, Shipp MA, Scharer B, Stefano GB, 1990. Interactions of immunoreactive monokines (interleukine-1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87: 4 426 - 4 429.
- Jones D, 1996. Biochemical interaction between *Chelonine* wasps and their lepidopteran hosts: after a decade of research-the parasite is in control. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 981 - 996.
- Kinuthia W, Li DM, Schmidt O, Theopold U, 1999. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *J. Insect Physiol.*, 45: 501 - 506.
- Kitano H, 1986. The role of *Apanteles glomeratus* venom in defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. *J. Insect Physiol.*, 32: 369 - 375.
- Kraaijeveld AR, van Alpen JM, 1994. Geographical variation in resistance of the parasitoid *A. tabida* against encapsulation by *D. melanogaster* larvae: the mechanism explored. *Physiol. Entomol.*, 19: 9 - 14.
- Luckhart S, Webb BA, 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Dev. Com. Immunol.*, 20: 1 - 21.
- Marris GC, Bell HA, Naylor JM, Edwards JP, 1999. The role of *Pimpla hypochondriaca* venom in the suppression of pupal noctuid immunity. *Entomol. Exp. Appl.*, 93: 291 - 298.
- Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S, Genedani S, 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell*, 85: 87 - 91.
- Parkinson N, Richard EH, Conyers C, Smith I, Edwards JP, 2002. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 729 - 735.
- Qin QL, Gong H, Ding C, Wang FH, 2000. Embryogenesis and larval

- development of *Microplitis mediator* parasitizing *Mythimna separata* and occurrence of teratocytes. *Acta Entomol. Sinica*, 43 (3): 280–284. [秦启联, 龚和, 丁翠, 王方海, 2000. 中红侧沟茧蜂在粘虫体内的发育及畸形细胞发生. *昆虫学报*, 43 (3): 280–284]
- Richard EH, Parkinson NM, 2000. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 76: 33–42.
- Richards E, Edwards JP, 1999. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*: effects of parasitization, venom and starvation on host haemocytes. *J. Insect Physiol.*, 45: 1 073–1 083.
- Richards E, Edwards JP, 2000. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte-mediated recognition of non-self and phagocytosis. *J. Insect Physiol.*, 46: 1–11.
- Rivers DB, Ruggiero L, Hayes M, 2002. The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *J. Insect Physiol.*, 48: 1 053–1 064.
- Shelby KS, Webb BA, 1999. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *J. Insect Physiol.*, 45: 507–514.
- Stoltz DB, Guzo D, Belland ER, Lucarotti CJ, Mackinnon EA, 1988. Venom promotes uncoating *in vitro* and persistence *in vivo* of DNA from a braconid polydnavirus. *J. Gen. Virol.*, 69: 903–907.
- Strand MR, Dover BA, 1991. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 18: 131–145.
- Strand MR, McKenzie DI, Grassl V, Dover BA, Aiken JM, 1992. Persistence and expression of *Microplitis demolitor* polydnavirus in *Pseudoplusia includens*. *J. Gen. Virol.*, 73: 1 627–1 635.
- Strand MR, Noda T, 1991. Alterations in the hemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *J. Insect Physiol.*, 37: 839–850.
- Strand MR, Peach LL, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 31–56.
- Tanaka T, 1987a. Effects of the venom of endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. *J. Insect Physiol.*, 33: 413–420.
- Tanaka T, 1987b. Morphological changes in haemocytes of the host, *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 57–67.
- Vinson SB, 1990. How parasitoids deal with the immune system of their host: an overview. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 13: 3–27.
- Vinson SB, Pennacchio F, Lanzrein B, 1998. Interaction between parasitoids and their hosts: an introduction and perspective. *J. Insect Physiol.*, 44: 701–702.
- Wago H, Tanaka T, 1989. Synergistic effects of calyx fluid and venom of *Apanteles kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the granular cells of *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Zool. Sci.*, 6: 691–696.
- Webb BA, Luckhart S, 1996. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. *J. Insect Physiol.*, 42: 33–40.
- Ye GY, Hu C, 1998. The immune-suppression strategy of parasitoids against the immune system of their hosts and its prospective in insect pest control. In: Yu XP ed. *Developing Strategies and Approaches of Nuisance Free Agriculture in China*. Beijing: Chinese Agricultural Press. 134–146. [叶恭银, 胡萃, 1998. 寄生蜂防御寄主免疫系统的策略及其在害虫防治中的应用前景. 见: 俞晓平主编. 中国无公害农业的发展策略和途径. 北京: 中国农业出版社. 134–146]
- Yin LH, Wang CZ, Qin JD, 2001. Polydnavirus and its functions in parasitoid-host interactions. *Acta Entomol. Sinica*, 44 (1): 109–118. [尹丽红, 王琛柱, 钦俊德, 2001. 多分 DNA 病毒及其在寄生蜂与寄主关系中的作用. *昆虫学报*, 44 (1): 109–118]

(责任编辑: 黄玲巧)