

核型多角体病毒对斜纹夜蛾酚氧化酶活性及血淋巴黑化的影响

季香云^{1,2} 包杨滨¹ 万年峰¹ 蒋杰贤¹ 谭继才²

1. 上海市农业科学院生态环境保护研究所/上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403;

2. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128

摘要 以斜纹夜蛾核型多角体病毒(SINPV)为免疫刺激因子, 观察 SINPV 对斜纹夜蛾幼虫酚氧化酶活性及其血淋巴黑化的影响。结果表明, 斜纹夜蛾幼虫感毒后, 其血淋巴黑化率在感毒 1 d 后开始逐渐下降, 随着感毒时间推移和幼虫日龄增大, 病毒抑制其黑化作用增强; 在感毒后连续 5 d 观察时间内, 感毒幼虫血淋巴黑化率始终低于健康幼虫, 且在感毒 4~5 d 后达到显著水平; 感毒幼虫体内及其血淋巴酚氧化酶活性在感毒前后 3 d 都是逐渐上升而后逐渐下降; 感毒幼虫体内酚氧化酶活性在感毒前后 3 d 高于健康幼虫, 在感毒 4 d 后开始低于健康幼虫, 且在感毒 2、3、5 d 后均达到显著水平; 与健康幼虫相比, 感毒幼虫血淋巴酚氧化酶活性在感毒 2 d 后开始明显增强, 但感毒 5 d 后急剧下降。

关键词 斜纹夜蛾核型多角体病毒(SINPV); 斜纹夜蛾; 黑化反应; 酚氧化酶; 血淋巴

中图分类号 Q 965.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0047-04

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabriciu) 属鳞翅目夜蛾科, 是爆发性害虫之一, 严重影响农作物的生长和蔬菜的产量与品质。斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus, SINPV) 是斜纹夜蛾自然种群密度的重要调节因子, 室内或田间试验均发现该病毒有很强的毒力, 在斜纹夜蛾的防治中具有重要作用^[1]。

昆虫在受到外来病原物侵染后会产生体液免疫和细胞免疫, 其中酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 是重要的体液免疫因子。在免疫抑制过程中, 昆虫机体往往会通过黑化作用清除外来侵染物, 而酚氧化酶是催化黑色素形成的重要调节因子。已有的研究表明, 真菌、细菌、病毒、寄生虫等外来病原物侵入后会引发昆虫体内酚氧化酶发生变化。目前, 斜纹夜蛾核型多角体病毒对斜纹夜蛾的防治效果与应用报道较多, 但有关该病毒对斜纹夜蛾的致病机理尚不清楚^[2-4]。

为探索斜纹夜蛾核型多角体病毒感染对斜纹夜蛾体液免疫的影响, 本试验以斜纹夜蛾核型多角体病毒为免疫刺激因子, 观察核型多角体病毒感染对

斜纹夜蛾酚氧化酶和黑化反应的影响, 旨在为研究病毒感染对靶标昆虫的免疫机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

斜纹夜蛾核型多角体病毒(SINPV)系 2011 年 8 月从上海市奉贤区菜地上采集感病的斜纹夜蛾幼虫, 在室内经宿主幼虫增殖 2 次后所得。试验时将斜纹夜蛾幼虫的虫尸匀浆后进行粗提, 粗提液经差速离心并稀释至试验所需浓度。供试斜纹夜蛾均用人工饲料(主要成份为麦胚、黄豆粉、抗坏血酸、酵母、干酪素等)在人工气候培养箱中喂养。斜纹夜蛾饲养条件: 温度(28±1)℃、相对湿度 80%±5%、光周期 L/D=14/10 h。

1.2 试验设计

设置斜纹夜蛾 2 龄初幼虫感毒后 1、2、3、4、5 d 共 5 个不同时间处理, 观察不同时间斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化情况, 同时测定斜纹夜蛾幼虫体液和血淋巴中的酚氧化酶活性。病毒接种浓度为 1.68×10⁸ OB/mL。对照为同等大小、同龄期健康的斜纹

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171904)、上海市科委青年科技启明星项目(12QB1402500)、上海市重点基础研究项目(11JC1411500)和上海市科委科技专项(123919N0400)

季香云, 博士, 副研究员. 研究方向: 害虫综合治理. E-mail: hwfy2002@163.com

通信作者: 蒋杰贤, 博士, 研究员. 研究方向: 害虫生态治理. E-mail: jiangjexian@163.com

夜蛾幼虫。感毒幼虫和健康幼虫各 300 头,每处理重复 3 次。

1.3 酶液提取

取存活斜纹夜蛾幼虫虫体放入匀浆器中,加入 CAC 缓冲液,在冰上充分研磨,研磨后在 4℃、10 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,离心 2~3 次,直至无大颗粒为止,取上清液即为粗酶液。

1.4 血淋巴收集

用医用解剖针挑破存活斜纹夜蛾幼虫第 3 和第 4 腹节之间的腹部,在冰冻的抗凝剂缓冲液中用毛细管收集一定量的血淋巴,在 4℃、800 r/min 下离心 10 min,去掉血细胞和其他组织残骸,收集上清液置于 -20℃ 保存待用。

1.5 蛋白浓度测定

参照 Bradford^[5] 的方法,配制 50 mL 0.15 mol/L NaCl 和 5 mL 1 μg/μL 牛血清白蛋白溶液。分别取不同体积数量的牛血清白蛋白,与 NaCl 溶液及蛋白溶液混匀,在 595 nm 条件下测 *D* 值,绘出标准曲线,分别测样品中的蛋白浓度。

1.6 酚氧化酶活性测定

参照冯从经等^[6]的方法,取 50 μL 不同处理组粗酶液及 40 μL 0.1 mol/L 氯代十六烷基吡啶 (CPC) 于比色杯中混匀,30℃ 下温育 10 min,再加入 50 μL 0.02 mol/L *L*-3,4-二羟基苯丙氨酸 (*L*-DOPA) 作为底物继续温育 1 min,加入 CAC 缓冲液至总体积 3.0 mL,测定 490 nm 处 1 min 内吸光值的增大值。以每毫克蛋白吸光值增大 0.001 为 1 个酶单位 (U),并设置空白管、样本管,重复 6 次,计算酶活性。处理后 5 d 内,每天重复测定感毒幼虫和健康幼虫的虫体及血淋巴酚氧化酶活性各 6 次。

1.7 血淋巴体外黑化反应观察

参照冯从经等^[6]的方法,将未稀释并未加入二苯氨基脲的斜纹夜蛾幼虫血淋巴滴在 Parafilm 膜上,在室温下放置 20 min,观察血淋巴颜色的变化。当颜色由淡乳白色变为黑褐色则记为正常黑化,而仍保持原来颜色的则记为黑化反应被抑制。每组观察 30 头存活幼虫血淋巴黑化情况,计算黑化率。感毒幼虫和健康幼虫各重复 6 次。

1.8 数据处理

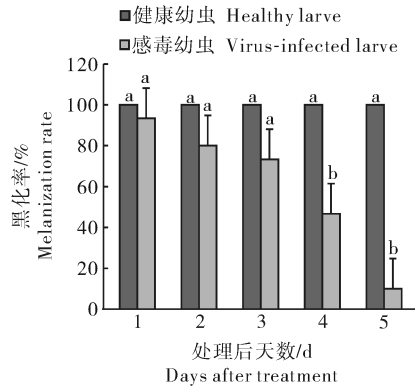
利用 Microsoft Excel 计算供试斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化率及其酚氧化酶活性,采用 SPSS16.0 软件对试验数据进行差异分析并用 Compaired-t 进行检验。

2 结果与分析

2.1 SINPV 对幼虫血淋巴黑化率的影响

由图 1 可知,在连续 5 d 的观察时间内,健康斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化率始终为 100%,而感毒斜纹夜蛾幼虫黑化率在感毒 1 d 后开始逐渐下降。这表明核型多角体病毒感染在斜纹夜蛾幼虫体内发挥了重要作用,随着感毒后时间推移和宿主日龄增大,病毒抑制宿主幼虫血淋巴黑化作用增强。

核型多角体病毒感染对斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化反应有较强的抑制作用,感毒斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化率始终低于健康幼虫且在感毒 4~5 d 后达到显著水平,感毒 5 d 后病毒对斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化反应抑制作用最强,其黑化率为 10%。



误差线表示标准误;临近柱形上不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著。Error bars denote SE; different little letters on the adjacent bars indicate that the means are significantly different at $P < 0.05$.

图 1 SINPV 对斜纹夜蛾幼虫血淋巴黑化率的影响
Fig. 1 Effect of SINPV infection on the melanization rate in the hemolymph of larval *S. litura*

2.2 SINPV 对幼虫体内酚氧化酶活性的影响

核型多角体病毒感染斜纹夜蛾后,健康和感毒幼虫体内酚氧化酶活性结果见表 1。由表 1 可知,健康和感毒斜纹夜蛾幼虫体内的酚氧化酶活性在处理 1 d 后均最低,分别为 3.686 U/mg 和 3.872 U/mg。健康幼虫血淋巴中酚氧化酶活性在处理 5 d 内逐渐上升(最大值为 17.320 U/mg),而感毒幼虫在感毒后前 3 d 逐渐上升(最大值为 14.035 U/mg),之后逐渐下降。与健康幼虫相比,感毒后前 3 d 内核型多角体病毒对斜纹夜蛾幼虫体内酚氧化酶活性有较强的促进作用,且在感毒 2~3 d 后达到显著水平。然而,感毒 4 d 后这种促进效应消失,

且感毒 5 d 后病毒显著抑制了宿主幼虫体内酚氧化酶活性。

表 1 SINPV 对斜纹夜蛾幼虫体内酚氧化酶活性的影响¹⁾

处理后天数/d Days after treatment	健康幼虫 Healthy larvae	感毒幼虫 Virus-infected larvae
1	3.686±0.038 a	3.872±0.405 a
2	5.180±0.811 a	9.150±0.413 b
3	6.186±0.532 a	14.035±1.160 b
4	9.064±1.102 a	8.2474±1.276 a
5	17.320±1.446 a	6.8713±0.829 b

1)数据后不同字母表示在 5% 水平上差异显著(下表同)。Data with the different letters in column are significant difference at 5% level (the same as following table).

2.3 SINPV 对幼虫血淋巴酚氧化酶活性的影响

核型多角体病毒感染斜纹夜蛾后,健康和感毒幼虫血淋巴中酚氧化酶活性结果见表 2。由表 2 可知,在连续 5 d 的观察时间内,随着斜纹夜蛾幼虫日龄增大,健康斜纹夜蛾幼虫血淋巴酚氧化酶活性逐渐增大,最高值为 22.115 U/mg。感毒斜纹夜蛾幼虫血淋巴酚氧化酶活性在感毒后前 3 d 内逐渐上升,之后逐渐下降,最高值为 19.595 U/mg。

与健康斜纹夜蛾幼虫相比,感毒幼虫血淋巴酚氧化酶活性在感毒 1 d 后略低,而在感毒 2 d 后开始明显增强且在感毒后 2~3 d 达到显著水平。然而,感毒 5 d 后感毒幼虫血淋巴酚氧化酶活性急剧下降,较健康斜纹夜蛾下降 57.341%。

表 2 SINPV 对斜纹夜蛾幼虫血淋巴酚氧化酶活性的影响

处理后天数/d Days after treatment	健康幼虫 Healthy larvae	感毒幼虫 Virus-infected larvae
1	5.919±0.394 a	4.519±0.219 b
2	8.439±0.626 a	11.905±0.536 b
3	10.177±0.442 a	19.595±0.578 b
4	12.069±0.629 a	13.611±1.371 a
5	22.115±0.496 a	9.434±0.644 b

3 讨 论

昆虫血淋巴的黑化作用是昆虫体液免疫防御反应的重要生化过程,与卵壳和表皮的形成、伤口愈合及对侵染物的包裹作用有密切关系^[7-8],这在昆虫抵御外来侵染因子的研究中报道较多,而在病毒感染机制中鲜见报道^[9-10]。本试验结果表明,核型多角体病毒可以明显抑制斜纹夜蛾幼虫血清黑色素的产生。这可能包括两方面原因:一是由于病毒感染宿主后其 PO 活性下降致使黑色素减少;二是由于病

毒感染引起宿主幼虫体液的应激反应,产生更多的活性氧自由基(ROS),引起有机体损坏,抑制黑色素前体物醌的形成。

有关昆虫体内酚氧化酶活性变化与病毒感染的对应关系已有报道。孟海燕等^[11]认为小菜蛾可能通过黑化作用对抗颗粒体病毒(GV),GV 感染虫体后其 PO 活性在连续 7 d 观察时间内始终高于未感毒幼虫。本试验结果表明,SINPV 感染斜纹夜蛾幼虫后前 3 d 其虫体 PO 活性高于未感毒幼虫,这可能是由于病毒侵入前期激活了宿主体内的免疫反应,为抵御病毒入侵,作为昆虫免疫体系的重要因子酚氧化酶同样被激活,其活性进而不断上升。随着 SINPV 在宿主体内不断增殖,宿主体内的酶系统受破坏也越严重,病毒可能会抑制酚氧化酶活性,这也是感毒 4 d 后开始感毒幼虫 PO 活性明显降低并低于健康幼虫的重要原因。这与吴洁芳等^[12]的研究结果相似。

从黑色素的产生过程可知,酚氧化酶在其中充当催化激活作用,血淋巴黑色素与酚氧化酶活力有直接关系^[13-14]。随着宿主日龄增大,宿主血淋巴黑化率始终下降,而血淋巴酚氧化酶活性在感毒后前 3 d 逐渐上升,但在感毒 4 d 后急剧下降,说明斜纹夜蛾感毒后其血淋巴黑化率的变化与酚氧化酶活性的关系也非固定不变。本试验只对感染病毒后斜纹夜蛾幼虫虫体与血淋巴酚氧化酶活性以及其血淋巴黑色素对病毒的免疫反应作了初步研究。有关该病毒对宿主斜纹夜蛾其他免疫系统反应的影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 蒋杰贤,朱亚芳,万年峰,等.斜纹夜蛾核型多角体病毒对宿主子代的弱化作用[J].华中农业大学学报,2011,30(5):599-603.
- [2] DUAN L, OTVOS I S. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. Environment Entomology, 2011, 30: 136-146.
- [3] ROELVINK P W, CORSARO B G, GRANADOS R R. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaleetia unipuncta* granulovirus enhancing [J]. Journal of General Virology, 1995, 76: 2693-2705.
- [4] MAEDA S, MUKOHARA Y, KONDO A. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spo-*

- dooptera litura* [J]. Journal of General Virology, 1990, 71: 2631-2639.
- [5] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [6] 冯从经, 邱鸿贵, 邱中良, 等. 腰带长体茧蜂对亚洲玉米螟幼虫体内酚氧化酶活性的影响 [J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 298-304.
- [7] HOPKINS T L, KRAMER K J. Insect cuticle sclerotization [J]. Annu Rev Entomol, 1992, 32: 71-93.
- [8] GILLESPIE J P, KANOST M R, TRENAEK T. Biological mediators of insect immunity [J]. Annu Rev Entomol, 1997, 42: 611-641.
- [9] SHELBY K S, WEBB B A. Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity [J]. J Insect Physiol, 1999, 45: 507-514.
- [10] 尹丽红, 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫齿唇姬蜂对棉铃虫血淋巴酚氧化酶的影响 [J]. 科学通报, 2001, 46(5): 1303-1307.
- [11] 孟海燕, 张亚琴, 王林华, 等. 颗粒体病毒对小菜蛾幼虫酚氧化酶及保护酶活性的影响 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2010, 44(2): 274-277.
- [12] 吴洁芳, 匡石滋, 王晓容, 等. 核型多角体病毒对斜纹夜蛾两种酶活性的影响 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2004, 17(2): 23-27.
- [13] 王英, 黄复生. 昆虫天然免疫的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24(4): 473-478.
- [14] NAPPIA J, CHRISTENSEN B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions application to insect innate immunity [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(5): 443-459.

Effect of SINPV on the phenol oxidase activity and hemolymph melanization of the infected larval *Spodoptera litura* (Fabriciu)

JI Xiang-yun^{1,2} BAO Yang-bin¹ WAN Nian-feng¹ JIANG Jie-xian¹ TAN Ji-cai²

1. Eco-environment Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences / Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China;

2. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract The influence of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV) on the phenol oxidase activity and haemolymph black of the *Spodoptera litura* (Fabriciu) larvae was observed by using SINPV as the immune stimulating factor. The results indicated that the melanization rate in the hemolymph of the host larvae infected with SINPV at the early 2nd instar began to decrease gradually from day 1 after the virus infection, the ability of the virus in inhibiting the melanization was enhanced with the passage of time after the virus infection and with the increase of host day age; within the 5-day observation time after infection, the percentage of melanization was consistently lower in virus-infection group than non-infected (healthy) group and this difference was significant on days 4 and 5 after infection; in virus infected group, the phenoloxidase activities in the larval body and in the hemolymph of *S. litura* larvae gradually rose up in the first three days after infection but then dropped down; the phenoloxidase activity in the larval body of *S. litura* larvae was consistently higher during the first three days but began to be lower from days 4 after infection in the virus-infected group than non-infected group, and this difference was significant on days 2, 3 and 5; compared to that in non-infected group, the phenoloxidase activity in the hemolymph of the host larvae in virus infected group began to be enhanced from days 2 after infection but sharply dropped down on days 5 after infection.

Key words *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV); *Spodoptera litura* (Fabriciu); melanization; phenoloxidase; hemolymph