

绿僵菌侵染对椰心叶甲酚氧化酶活性的影响^{*}

王九辉 张世清 黄俊生^{**}

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

Effects of *Metarhizium anisopliae* on the activity of Phenoloxidase in *Brontispa longissima*. WANG Jiu-Hui, ZHANG Shi-Qin, HUANG Jun-Shen^{**} (*Environment and Plant Protection Institution, State Key Biotechnology Laboratory for Tropic Crop, Chinese Academy of Tropic Agriculture, Haikou 571101, China*)

Abstract The activity of phenoloxidase in the haemolymph of *Brontispa longissima* (Gestro) infested by *Metarhizium anisopliae* MA-4 was investigated. The phenoloxidase activity in nomol insects was found primarily on the plasma and hemocyte lysate solution, and increased significantly when laminarin and tyrosinase as elicitors was present. The activity of phenoloxidase in infected group was higher than that in uninfected group ($P < 0.05$), but the activity of phenoloxidase induced by injection $10 \mu\text{g}$ laminarin in infected group is significant lower than that in uninfected group ($P < 0.05$). These results suggested that *M. anisopliae* infection activated the prophenoloxidase system of *B. longissima*, and also suppress the prophenoloxidase system activation which induced by laminarin.

Key words *Brontispa longissima*, Phenoloxidase, *Metarhizium anisopliae*, haemolymph

摘要 对椰心叶甲 *Brontispa longissima* (Gestro) 成虫血淋巴中酚氧化酶的特性进行分析, 并研究绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 侵染对血浆甲酚氧化酶活性的影响。结果显示, 椰心叶甲成虫的血浆及血细胞裂解液中均检测到酚氧化酶活性, 且昆布多糖及胰蛋白酶可显著提高其活性。绿僵菌 MA-4 侵染组在侵染后第 1 至第 5 d 的血浆酚氧化酶活性高于未侵染组 ($P < 0.05$), 但是椰心叶甲成虫体内注射 $10 \mu\text{g}$ 昆布多糖后, 侵染组的酚氧化酶活性显著低于未侵染组 ($P < 0.05$), 表明绿僵菌一方面可对激活椰心叶甲的酚氧化酶原激活系统, 另一方面又可抑制昆布多糖对椰心叶甲酚氧化酶原激活系统的诱导作用。

关键词 椰心叶甲, 酚氧化酶, 绿僵菌, 血淋巴

酚氧化酶原激活系统是昆虫最重要的体液免疫系统之一, 在抵御病原体的入侵、表皮硬化及伤口愈合等反应中均发挥着重要的作用^[1]。酚氧化酶是该系统中的重要组成部分, 它催化单酚转化为二酚, 并把二酚氧化成醌, 醌最终经非酶促反应生成黑色素, 这是黑化现象的关键步骤。黑色素在伤口部位的沉着可防止失血, 沉积在外来入侵物周围可抑制其生长繁殖。酚氧化酶原的激活过程中还可产生细胞毒性分子, 进一步增强寄主的防御能力^[2]。酚氧化酶在昆虫体内一般以无活性的酚氧化酶原形式存在于血浆或血细胞中, 并可以被病原微生物的细胞壁成分、脂多糖、胰蛋白酶、以及某些化学物质如 SDS、甲醇等通过级联反应激活。

绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 是虫生真菌的主要类群之一, 寄主范围广, 致病力强, 对人、

畜、作物无毒害, 是一种具有良好应用前景的虫生真菌, 目前已用于多种害虫如蝗虫、金龟子、白蚁等的防治^[3]。绿僵菌对昆虫的侵染过程包括分生孢子在寄主昆虫体表附着、萌发、入侵以及寄主的免疫反应^[4]。绿僵菌对昆虫的致病力不但取决于菌种本身的毒力, 同时还与昆虫的免疫能力具有重要关系。研究表明, 昆虫在受到微生物侵染时体内可迅速产生免疫反应, 其中主要有血细胞和体液 2 种反应, 酚氧化酶激活系统就是其中重要的一种防御系统, 因此, 绿僵菌的成功侵入过程中必须克服寄主体内一系列的免疫反应。椰心叶甲 *Brontispa longissima*

^{*} 科技部社会公益研究专项 (2005DIB4J043)。

^{**} 通讯作者, Email: h888111@126.com

收稿日期: 2006-06-29, 修回日期: 2006-08-05

(Gestro)是一种可危害棕榈科多种重要经济林木的危险性害虫^[1],利用绿僵菌对椰心叶甲进行生物防治被证明是一种有效的措施^[5],但是绿僵菌侵染后对椰心叶甲酚氧化酶原激活系统的影响尚未见研究报道。我们对椰心叶甲血淋巴中的酚氧化酶的活性以及绿僵菌菌株侵染对该酶活性的影响进行了研究,旨在了解绿僵菌对椰心叶甲体液免疫的影响。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试椰心叶甲采自海南海口,采集后置于养虫箱内,室温 25~30℃,相对湿度>90%,以海南椰子未展开的嫩叶饲养,每 3 d 更换 1 次新鲜叶片。取羽化 10~15 日龄的成虫用于试验。

1.2 血浆及细胞裂解液的制备

剪去椰心叶甲头部,待血淋巴自然流出后以微量移液器转移至含 10 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液中(50 mmol/L, pH 7.0)。12 000 r/min, 4℃离心 5 min,上清液即为血浆,血细胞沉淀以 Tris 缓冲液(50 mmol/L Tris, 400 mmol/L NaCl, pH 7.5)清洗 1 次,重悬于 50 mmol/L 磷酸缓冲液中,以超声匀浆器将血细胞匀浆,12 000 r/min, 4℃离心 5 min,上清即为血细胞裂解液。

1.3 酚氧化酶活性的测定

酚氧化酶活性以 L-DOPA 转化成多巴色素时 490 nm 处吸光值表示^[6]。取已制备的血浆或血细胞裂解液 40 μL 置于 2 mL 离心管中,加入以磷酸缓冲液配制的 3 mg/mL L-DOPA 溶液 160 μL,室温下反应 30 min,于 490 nm 处测光吸收值。1 个酶活单位定义为每 min 每 mg 蛋白的 OD₄₉₀ 值。蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法,以小牛血清白蛋白制作标准曲线,以考马斯亮蓝 G 250 染色后测 OD₅₉₅ 值。

为考察激活剂对酚氧化酶原的体外激活作用,取昆布多糖(3 mg/mL)、胰蛋白酶(2 mg/mL)、SDS(1 mg/mL)以及甲醇各 50 μL,分别与等量血浆或血细胞裂解液混合,室温下孵育 5 min,按上述方法测定酚氧化酶活性。

1.4 绿僵菌侵染试验

取椰心叶甲成虫 100 只,以 1×10⁷ 的绿僵菌孢子悬浮液均匀喷洒自然风干后 95% 湿度, 28℃ 饲养。侵染后每日取 8 只椰心叶甲进行酚氧化酶活性测定,同时取 8 只未侵染的椰心叶甲用于对照组测定。

为考察绿僵菌侵染对昆布多糖提高椰心叶甲酚氧化酶活性作用的影响,取椰心叶甲成虫 200 只,随机分为 2 组,每组 100 只,分别为侵染注射组和侵染未注射组,另取未侵染的成虫 100 只随机分成对照注射组和对照未注射 2 组。对侵染组按前法进行绿僵菌的侵染,侵染后第 1, 3, 5 d 对侵染注射组及对照注射组以微量注射器自椰心叶甲腹甲间隙注射 10 μg 昆布多糖,并于注射后 2 h 取血淋巴测定血浆酚氧化酶活性,同时对未注射组的酚氧化酶活性也进行测定。

1.5 统计分析

所有数据均以平均数(标准差表示,采用 ANOVA 法对绿僵菌侵染试验中各组椰心叶甲的酚氧化酶活性进行比较, P<0.05 则认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 椰心叶甲酚氧化酶的分布

在椰心叶甲的血浆和血细胞裂解液中均检测到酚氧化酶的活性,且活性水平相当,分别为(0.285 7±0.057 6)U 和(0.296 7±0.068 5)U,表明椰心叶甲的酚氧化酶在血细胞和血浆中的分布没有差异。

2.2 激活剂对酚氧化酶的体外激活作用

体外激活试验表明,昆布多糖、胰蛋白酶以及 SDS 对血浆和血细胞的酚氧化酶原具有不同程度的激活作用,其中以昆布多糖的激活作用最强,可使酚氧化酶的活性提高 5 倍以上,其次是胰蛋白酶,可使酚氧化酶活性提高 3 倍左右,而 SDS 的激活作用较弱。甲醇对椰心叶甲的酚氧化酶原没有激活作用(图 1)。

2.3 绿僵菌对酚氧化酶活性的影响

绿僵菌侵染后自第 3 d 开始出现椰心叶甲

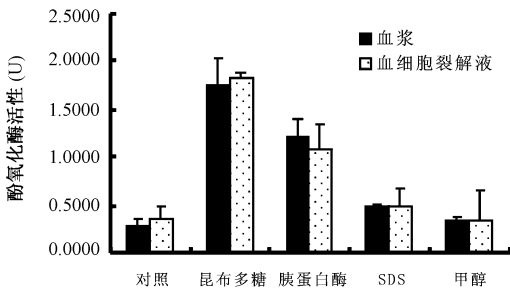


图1 激活剂对椰心叶甲血浆及血细胞裂解液中酚氧化酶活性的影响

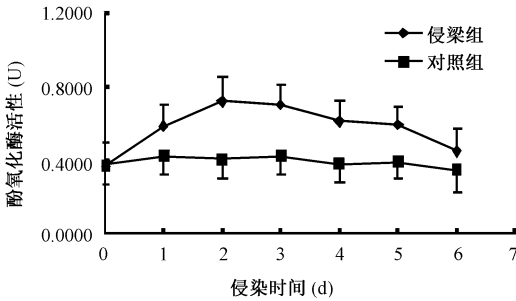


图2 绿僵菌侵染对椰心叶甲血浆酚氧化酶活性的影响

活性,同时对未注射组也进行酶活性的测定,结果见表1。对注射组的酚氧化酶活性均显著大于对照未注射组,显示绿僵菌侵染之前,体内注射昆布多糖可显著提高椰心叶甲的酚氧化活性。侵染注射组的酚氧化酶的活性均显著低于对注射组 ($P < 0.05$),表明绿僵菌侵染后昆布多糖对酚氧化酶原的诱导激活作用显著下降。另外,在侵染的第3和第5 d,侵染注射组的酚氧化酶的活性与侵染未注射组相比没有显著性差异,说明绿僵菌侵染一段时间后,酚氧化酶原已基本不能被昆布多糖激活。

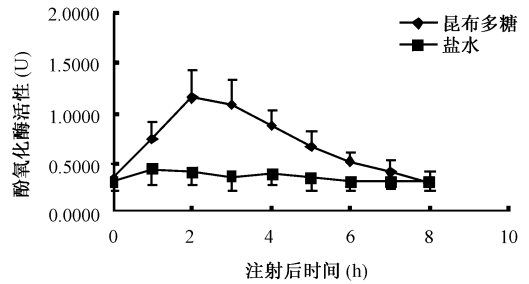


图3 体内注射 10 μg 昆布多糖或盐水后椰心叶甲血浆的酚氧化酶活性

的死亡,至第7 d死亡率已达 100% (死亡率统计中包括用于酚氧化测定的椰心叶甲),因此侵染试验的酚氧化酶活性测定至侵染后第6 d。结果显示,椰心叶甲在受到绿僵菌 MA-4 侵染后的第1 d即出现酚氧化酶的活性的上升,与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$),并于侵染后第2 d即达高峰,较侵染前约提高2倍左右,以后维持在一个较高水平,至侵染后第4 d开始出现下降,但仍高于对照组的酶活水平,至侵染后第6 d,酶活水平与对照组相比已没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图2)。

2.4 绿僵菌侵染对昆布多糖体内激活酚氧化酶活性作用的影响

椰心叶甲成虫体内注射 10 μg 昆布多糖对酚氧化酶原具有显著的激活作用。注射1 h后,血浆酚氧化酶的活性迅速上升,2 h即达高峰,酶活性为注射昆布多糖前的4倍,以后逐渐下降,至8 h后恢复正常(图3)。因此,我们于注射昆布多糖后2 h测定各注射组的酚氧化酶

3 讨论

昆虫的酚氧化酶原激活系统类似于哺乳动物的补体系统,在昆虫的免疫防御中起着关键作用,而酚氧化酶是该系统中的关键成分,其无活性的酶原通常存在于昆虫的血细胞或血浆中,并可受多种物质的激活。本试验对昆布多糖、胰蛋白酶、甲醇及SDS等几种常见的酚氧化酶原激活剂对椰心叶甲酚氧化酶活性的影响的研究结果表明,昆布多糖和胰蛋白酶对其具有显著的激活作用,其中又以昆布多糖的激活作用最强,可使酚氧化酶的活性升高5倍左右,而甲醇和SDS则没有明显的激活作用。结果还表明,昆布多糖和胰蛋白酶对椰心叶甲血浆及血细胞的酚氧化酶原的激活作用没有明显差异,表明椰心叶甲的酚氧化酶原并存于血细胞和血浆中。

表 1 绿僵菌侵染对昆布多糖提高椰心叶甲酚氧化酶活性作用的影响($n=8$)

处理	酚氧化酶活性(U)		
	侵染后第 1 d	侵染后第 3 d	侵染后第 5 d
对照未注射组	0.3728±0.1435	0.4091±0.1341	0.3873±0.1042
对照注射组	1.0244±0.2182a	1.0606±0.2709a	1.0262±0.1893a
侵染未注射组	0.6028±0.1319	0.6897±0.1227a	0.4726±0.1230
侵染注射组	0.7909±0.1319b, c	0.6243±0.1765b	0.5479±0.1165b

a. 与对照未注射组相比, $P < 0.05$; b. 与对照注射组相比, $P < 0.05$; c. 与侵染未注射组相比, $P < 0.05$.

昆布多糖是一种典型的 $\beta-1, 3$ 葡聚糖, 而 $\beta-1, 3$ 葡聚糖为病原真菌细胞壁的主要组成成分, 是酚氧化酶原的一种激活剂, 昆布多糖体内注射可诱导昆虫的免疫反应, 激活酚氧化酶原并引起结节形成^[7]。我们的研究也表明, 昆布多糖不仅能在体外显著提高椰心叶甲血浆及血细胞裂解液中酚氧化酶的活性, 而且体内注射后亦可迅速提高椰心叶甲酚氧化酶的活性。

昆虫病原菌的侵染过程中将与寄主的免疫系统发生相互作用, 昆虫的免疫系统对病原真菌的入侵会产生防御反应, 例如酚氧化酶原激活系统可被病原真菌的细胞壁成份激活^[8]。本研究发现受绿僵菌侵染后的椰心叶甲血浆酚氧化酶活性显著高于未侵染组, 表明绿僵菌侵染可激活椰心叶甲的酚氧化酶原激活系统, 这种激活作用显然是椰心叶甲为抵抗绿僵菌的侵染而作出的防御反应。有研究报道认为绿僵菌侵染过程中为了克服寄主的抵抗力, 会对寄主的免疫系统产生抑制作用^[9], 并发现绿僵菌产生的破坏素可抑制由昆布多糖诱导的血细胞及酚氧化酶原的活化^[10]。我们的研究表明, 虽然椰心叶甲受绿僵菌侵染后其血浆酚氧化酶的活性升高, 但侵染后的椰心叶甲接受昆布多糖注射后, 酚氧化酶的活性水平要显著低于未侵染的椰心叶甲接受昆布多糖注射后的酶活性水平, 特别是在侵染的第 3 及第 5 d, 注射昆布多糖后的酚氧化酶活性与未注射昆布多糖的侵染组相比已没有显著性差异, 表明绿僵菌侵染后昆布

多糖激活椰心叶甲酚氧化酶原的作用受到了抑制, 甚至失去了激活作用。

总之, 我们对椰心叶甲的酚氧化酶的特性研究, 证明其可被昆布多糖及胰蛋白酶激活, 并发现绿僵菌侵染椰心叶甲后一方面可提高酚氧化酶的活性, 另一方面又可抑制昆布多糖对椰心叶甲酚氧化酶原激活系统的诱导作用。

参 考 文 献

- 1 Ashida M., Yamazaki H. I. In: Ohnishi E., Ishizaki H. (eds.), Molting and Metamorphosis. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1990. 239
- 2 O'Brien P. J. *Chary. Biol. Int.*, 1991, **80**(1): 1~41
- 3 代鹏, 宋妍, 许天委, 谢玉平, 黄俊生. 热带农业科学, 2006, **25**(2): 73~77.
- 4 王海川, 尤民生. 昆虫知识, 1999 **36**(3): 189~192
- 5 Liu S. D., Lin S. C., Shiao J. F. *J. Invertebr. Pathol.*, 1989, **53**(3): 307~314
- 6 Goldsworthy G., Opokar-Ware K., Mullen L. *J. Insect. Physiol.*, 2002 **48**(6): 601~608
- 7 Mullen L. M., Goldsworthy G. J. *J. Insect. Physiol.*, 2006, **52**(4): 389~398.
- 8 Ashida M., Ishizaki Y., Iwahana H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983 **113**(2): 562~568.
- 9 Gillespie J. P., Bumett C., Charnley A. K. *J. Insect. Physiol.*, 2000 **46**(4): 429~437.
- 10 Huxham I. M., Lackie A. M., McCorkindale N. J. *J. Insect. Physiol.*, 1989, **35**(2): 97~105
- 11 吴青, 梁广文, 曾玲, 陆永跃. 昆虫知识, 2006, **43**(4): 530~534.