

淡足侧沟茧蜂寄生对草地贪夜蛾幼虫血淋巴黑化反应及酚氧化酶的影响*

黄兰兰^{1,2**} 蒋杰贤² 王金彦² 张浩^{2***}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403)

摘要 【目的】明确淡足侧沟茧蜂 *Microplitis pallidipes* 寄生对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 血淋巴黑化率、酚氧化酶原 (Prophenoloxidase, PPO) 基因表达量和酚氧化酶 (Phenoloxidase, PO) 活性的影响, 为更有效的利用淡足侧沟茧蜂防控草地贪夜蛾提供理论依据。【方法】通过室内寄生实验确定草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生的最佳龄期; 通过 RT-qPCR 分析草地贪夜蛾两个 PPO 基因 (*SfPPO1* 和 *SfPPO2*) 的时空表达谱; 通过薄膜法统计草地贪夜蛾被寄生后的血淋巴黑化率; 采用吸光光度法测定草地贪夜蛾被寄生后的血淋巴 PO 活性; 采用 RT-qPCR 测定草地贪夜蛾被寄生后血淋巴 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 的相对基因表达量。【结果】草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生的最佳龄期为 3 龄幼虫, *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 均在卵块和 4 龄幼虫中基因表达量较高, 且主要在幼虫血淋巴中表达。草地贪夜蛾被寄生后 12、24、48 和 72 h 的血淋巴黑化率显著低于未寄生组 ($P < 0.05$), *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 的相对基因表达量和 PO 活性也低于未寄生组。相关关系分析表明, *SfPPO1* 的相对基因表达量与 *SfPPO2* 的表达量呈现线性关系 ($R^2 = 0.9124$), PO 活性与两个 PPO 基因相对表达量之间、黑化率与 PO 活性和 PPO 基因相对表达量之间均呈现正相关。【结论】淡足侧沟茧蜂寄生会抑制草地贪夜蛾血淋巴的黑化率, 下调血淋巴中酚氧化酶原基因的表达量和 PO 活性, 且 PO 活性、PPO 基因相对表达量及血淋巴黑化率 3 个指标之中, 两两之间均呈现正相关性。**关键词** 淡足侧沟茧蜂; 草地贪夜蛾; 黑化反应; 酚氧化酶; 生物防治

Effects of the parasitoid *Microplitis pallidipes* on the melanization and phenoloxidase activity of the hemolymph of *Spodoptera frugiperda* larvae

HUANG Lan-Lan^{1,2**} JIANG Jie-Xian² WANG Jin-Yan² ZHANG Hao^{2***}

(1. College of Life Science and Fishery, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Eco-environmental Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the effects of *Microplitis pallidipes* on the melanization, prophenoloxidase (PPO) gene expression and phenoloxidase (PO) activity, of the hemolymph of *Spodoptera frugiperda* larvae, and thereby provide a foundation for the more effective use of this endoparasitoid to control this pest. 【Methods】The *S. frugiperda* larval instar most susceptible to parasitism by *M. pallidipes* was determined experimentally and RT-qPCR was then used to analyze the temporal and spatial expression profiles of two *S. frugiperda* PPO genes. The melanization rate of larvae was counted using the film method, and the PO activity of larvae was measured using the absorbance method. The expression of *SfPPO1* and *SfPPO2* in the hemolymph of *S. frugiperda* was determined with RT-qPCR. 【Results】3rd instar *S. frugiperda* larvae were found to be the most susceptible to being parasitized by *M. pallidipes*. The relative expression of the two *SfPPO* genes in eggs and 4th instar larvae was relatively high, and both genes were mainly expressed in the hemolymph. Hemolymph melanization

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年基金 (32001969); 上海市自然科学基金 (20ZR1449000); 上海市农业科学院卓越团队建设项目 (2022-017, 2018[B-01]); 上海市农业科学院农业科技创新支撑领域研究专项 (生科创-GT2021)

**第一作者 First author, E-mail: 2839559296@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangvhaov@126.com

收稿日期 Received: 2021-11-08; 接受日期 Accepted: 2022-03-21

rates of parasitized larvae were significantly lower than those of the non-parasitized larvae after 12, 24, 48 and 72 hours ($P < 0.05$). *PPO* expression and *PO* activity of parasitized larvae were also lower than those of non-parasitized larvae. There was a strong, positive linear correlation between the expression of *PPO1* and *PPO2* ($R^2 = 0.9124$), and there were also positive correlations among *PO* activity, *PPO* expression and the melanization rate. **[Conclusion]** Parasitism of *M. pallidipes* inhibited the melanization of *S. frugiperda* larvae and down-regulated the expression of two *PPO* genes and *PO* activity. *PO* activity, *PPO* gene expression and melanization rate were all positively correlated.

Key words *Microplitis pallidipes*; *Spodoptera frugiperda*; melanization; phenoloxidase; biological control

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Smith, 属鳞翅目 Lepidoptera, 夜蛾科 Noctuidae, 是联合国粮农组织全球预警的迁飞性农业重大害虫, 于 2019 年初首次入侵我国云南地区, 并迅速扩散到我国多个省份(郭井菲等, 2019; 陈辉等, 2020; 吴孔明, 2020)。目前对草地贪夜蛾的防治普遍采用化学农药防治, 但草地贪夜蛾在美洲已被证明对几十种农药产生了抗药性(吴益东等, 2019; 闫文娟等, 2019), 因此有效利用寄生蜂等生物天敌防治草地贪夜蛾已成为目前防控草地贪夜蛾的重要手段(唐璞等, 2019; 黄海艺等, 2020)。

淡足侧沟茧蜂 *Microplitis pallidipes* Szepilgeti, 属膜翅目 Hymenoptera, 茧蜂科 Braconidae, 是甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、粘虫 *Mythimna separata* 等 2-3 龄夜蛾幼虫的优势寄生蜂, 广泛分布于我国浙江、山东、河北及台湾等省份, 其对甜菜夜蛾幼虫的自然寄生率可达 30%-47%(季香云等, 2017; Jiang *et al.*, 2018), 具有良好的生物防治效果。近期研究发现淡足侧沟茧蜂可用于草地贪夜蛾的生物防治, 其在 29 °C 对草地贪夜蛾的寄生效果最好(王金彦等, 2020)。淡足侧沟茧蜂能否成功寄生是寄生蜂的寄生因子与寄主的免疫系统“斗争”的结果, 在此过程中, 寄主的黑化反应是寄生蜂-寄主互作的关键因子(Dudzic *et al.*, 2015; 孟娥, 2017; 叶恭银等, 2019)。

黑化反应(Melanization)是昆虫抵御入侵病原物的一种先天免疫反应, 是昆虫免疫体系中重要的防御机制, 其反应产物黑色素既参与体液免疫, 又在细胞免疫中发挥重要作用(Nappi and Christensen, 2005)。黑化反应是由前酚氧化酶级联反应(Prophenoloxidase activating system,

proPO-As)介导引起(Cerenius and Soderhall, 2004; 陈晓宇等, 2015)。酚氧化酶作为黑化反应中最关键的酶, 已经在双翅目、鳞翅目、鞘翅目和膜翅目等昆虫中被发现并研究(Huang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2009)。例如, 烟草天蛾 *Manduca sexta* 的两个酚氧化酶原基因的氨基酸序列有 48% 的同源性, 并且有两对二硫键, 含有两个与分子氧和酚相互作用的含铜活性结合位点(Li *et al.*, 2009)。而草地贪夜蛾的两个酚氧化酶原基因 *SfPPO1* (GenBank: ABB92834) 和 *SfPPO2* (GenBank: ABB92835) 也已经被鉴定。

淡足侧沟茧蜂虽已经被证明可用于防控草地贪夜蛾(王金彦等, 2020), 但是对其寄生机理的研究还较少报道。本研究通过分析被淡足侧沟茧蜂寄生后的草地贪夜蛾血淋巴的黑化率、酚氧化酶原基因的表达量和酚氧化酶活性的变化, 明确淡足侧沟茧蜂对草地贪夜蛾黑化反应和酚氧化酶的影响, 对于更好的利用淡足侧沟茧蜂防控草地贪夜蛾及减少化学农药使用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

草地贪夜蛾和淡足侧沟茧蜂均采集于上海市奉贤区庄行镇上海市农业科学院基地(31°N, 121°E)。其中淡足侧沟茧蜂采自田间被寄生的斜纹夜蛾和甜菜夜蛾幼虫, 在实验室饲养至出茧并羽化为成虫, 后续以草地贪夜蛾幼虫作为寄主, 进行多代繁育, 以 10% 的蜂蜜水作为其营养来源。草地贪夜蛾低龄幼虫以新鲜玉米叶作为其食物来源, 老熟幼虫用人工饲料饲养, 待到预蛹时

期, 将其置于装有 1/4 土层的饲养瓶(高 16 cm, 直径 9.5 cm)中化蛹(杨亚军等, 2020)。两个种群均在人工气候培养箱(10L:14D、RH=80%±5%)条件下饲养, 并繁殖多个世代。

1.2 淡足侧沟茧蜂对不同龄期草地贪夜蛾幼虫的寄生效果

取羽化 1 d 的淡足侧沟茧蜂雌蜂和雄蜂各一头在玻璃试管(高 10 cm, 直径 1.5 cm)中交配 24 h, 期间用棉球蘸取蜂蜜水作为其食物来源, 共配对 16 组。取 16 个饲养瓶(高 8.5 cm, 直径 5.5 cm)均加入人工饲料, 并按照龄期 1 龄、2 龄、3 龄和 4 龄幼虫及寄主密度 10、20、30 和 40 头/瓶两两组合后分别放入草地贪夜蛾幼虫, 并贴好标签。再向 16 个饲养瓶中各加入一对已配对好的淡足侧沟茧蜂, 用报纸进行密封, 并用尖镊子扎上小孔透气。置于 29 °C 培养箱中观察, 24 h 之后取出淡足侧沟茧蜂, 为避免草地贪夜蛾的互相残杀, 将草地贪夜蛾幼虫分别置于玻璃试管中单头饲养, 直至出现发育缓慢, 且背部出现发黑的寄生症状, 进行寄生率的统计。每处理进行 3 次重复。

1.3 草地贪夜蛾 PPO 基因的时空表达谱分析

挑选草地贪夜蛾卵期、1-6 龄幼虫期、蛹及成虫期共 9 个发育阶段的样本置于 - 80 °C 冰箱中保存备用; 冰上解剖分离获得草地贪夜蛾 4 龄幼虫的血淋巴、中肠、马氏管、体壁和脂肪体共 5 个组织样品, 然后迅速于液氮中冰冻, 再置于

- 80 °C 冰箱中保存备用; 按照柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)使用说明进行提 RNA, 用分光光度计检测吸光度, 1% 琼脂凝胶电泳检测总 RNA 质量, 将所得的 RNA 溶液置于 - 80 °C 冰箱保存备用。按照反转录试剂盒对提取的 RNA 进行 cDNA 第一条链的合成, 得到的各样品的 cDNA 置于 - 20 °C 冰箱中保存备用。利用 Primer Premier5.0 软件, 按照 Real-time PCR 要求对选取的草地贪夜蛾内参基因 Actin (XM_035598605) 及目标基因 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 进行引物设计。由总 RNA 样品反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 按照 TransStart® Top Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书进行实时荧光定量 PCR 检测。所用引物见表 1。扩增程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行 45 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (每次增加 0.3 °C, 直到 95 °C); 95 °C 15 s; 反应体系为 20 μL: Primer exf/r 上下游引物 0.4 μL, 酶 buffer 10 μL, cDNA 1 μL 和 ddH₂O 8.2 μL。实时荧光定量 PCR 检测仪记录试验数据, 以 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.4 草地贪夜蛾幼虫被淡足侧沟茧蜂寄生后的血淋巴黑化率测定

将交配的淡足侧沟茧蜂置于预先放有 40 头草地贪夜蛾 3 龄幼虫的饲养瓶(高 12 cm, 直径 7.5 cm), 24 h 之后移去淡足侧沟茧蜂, 将草地

表 1 实验中所用的引物
Table 1 Primers used in the experiments

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank numbers	引物用途 Usage of primers
<i>SfActin</i> -F	TTCACCACCAACCGCTGAGAGG	XM_035598605	Real-time PCR
<i>SfActin</i> -R	TGACCGTCGGAAGTTCGTAGG	XM_035598605	
<i>SfPPO1</i> -F	CGGAGTCAGGATGCCAGTA	DQ289581	
<i>SfPPO1</i> -R	GCAGGTTGATGCCGATGT	DQ289581	
<i>SfPPO2</i> -F	CCATCAAGCATTGCCACCAACATC	DQ289582	
<i>SfPPO2</i> -R	TCAACGACGTTAGACAAGCGGATG	DQ289582	

贪夜蛾分装到玻璃试管中, 未寄生组为未被寄生的 3 龄草地贪夜蛾幼虫。分别测定未寄生组和寄生组处理后 12、24、48 和 72 h 的血淋巴黑化率。用无菌毛细管吸取未经稀释的被淡足侧沟茧蜂寄生之后的草地贪夜蛾幼虫的血淋巴于无色透明的薄膜上(薄膜下放置一张白色纸板), 室温无风 25 °C 条件下静置 20 min, 观察并记录血淋巴颜色的变化。当血淋巴的颜色由绿色或无色透明变为黑色或棕黑色时认为是正常黑化, 若不变色或变成了其他中间颜色则认为是黑化受到了抑制(Doucet and Cusson, 1996; 尹丽红等, 2001)。计算出各处理 40 头幼虫的血淋巴黑化率。寄生组和未寄生组的分别进行 3 次重复。

1.5 草地贪夜蛾幼虫被淡足侧沟茧蜂寄生后的 PO 活性测定

用已交配的淡足侧沟茧蜂雌蜂寄生 3 龄草地贪夜蛾幼虫, 处理后 12、24、48 和 72 h, 提取各处理的草地贪夜蛾血淋巴样品各 50 mg, 各处理均以相同大小的未被寄生的草地贪夜蛾幼虫作为对照。按 0.1 g/mL 质量浓度加至预冷的 pH 7.0 的 0.02 mol/L 磷酸钠盐缓冲液(PBS), 冰浴下温和搅匀, 4 °C 冰箱静置 30 min 后, 于 0 °C 条件下 4 000 r/min 离心 60 min, 除去液面上的脂类和色素后, 取上清液即为粗酶提取液。将上述粗酶液按照昆虫酚氧化酶(PO)酶联免疫吸附测定试剂盒(以酚氧化酶浓度表示酶活性, 上海江莱生物科技有限公司)使用说明书步骤操作在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。每处理设置 3 个重复。在 Excel 工作表格中, 以标准品浓度作横坐标, 对应 OD 值作纵坐标, 绘制标准曲线的回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度。

1.6 草地贪夜蛾幼虫被淡足侧沟茧蜂寄生后的 PPO 基因相对表达量测定

样本获得同 1.5, 将寄生后 12、24、48 和 72 h 草地贪夜蛾血淋巴及未寄生组血淋巴进行提取 RNA 并反转录。按照 TransStart® Top Green qPCR SuperMix (+Dye I / +Dye II) 荧光定量试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书进行实时荧光定量 PCR 检测各样本的 *SfPPO1* 和

SfPPO2 基因的相对表达量, 所用引物与 RT-qPCR 条件与 1.3 中相关描述一致。每处理 3 个重复。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量, 并进行数据处理。

1.7 草地贪夜蛾 PPO 基因相对表达量、PO 活性和黑化率的相关性分析

以草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生组以及未寄生组所测定的 *PPO* 基因相对表达量、PO 活性和黑化率数值进行相关性分析。将酶活性数值进行对数转换, 寄生率和血淋巴黑化率进行反正弦转换后, 拟合草地贪夜蛾寄生后 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* (*SfPPO1-SfPPO2*) 基因相对表达量、酶活性与 *SfPPOs* 基因相对表达量(PO-*SfPPO1*、PO-*SfPPO2*)、寄生后草地贪夜蛾血淋巴黑化率与 *SfPPOs* 基因相对表达量(黑化率-*SfPPO1*、黑化率-*SfPPO2*)、黑化率与酶活性(黑化率-PO)以及之间的相关性方程。

1.8 数据处理及分析

数据分析采用 SPSS 19.0 软件进行, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。将草地贪夜蛾血淋巴酶活性数值进行对数转换, 将寄生蜂对草地贪夜蛾的寄生率和草地贪夜蛾血淋巴黑化率进行反正弦转换后, 进行方差分析或 *t*-检验分析, 应用 Tukey's HSD 法进行处理间的差异显著性检验。

寄生率=被寄生的草地贪夜蛾数量/试验所用草地贪夜蛾总数×100%,

黑化率=血淋巴黑化的草地贪夜蛾数量/试验所用草地贪夜蛾总数×100%。

2 结果与分析

2.1 淡足侧沟茧蜂对不同龄期草地贪夜蛾幼虫的寄生效果分析

两因素方差分析表明, 淡足侧沟茧蜂对草地贪夜蛾幼虫的寄生率取决于幼虫龄期($F_{3,32}=249.16$, $P<0.0001$)、寄主密度($F_{3,32}=15.16$, $P<0.0001$)和两个因素的共同影响($F_{9,32}=2.57$, $P=0.0239$)(表 2)。淡足侧沟茧蜂对不同的寄主

密度的草地贪夜蛾 3 龄幼虫的寄生率最高,其次为 2 龄幼虫和 4 龄幼虫,而对 1 龄草地贪夜蛾幼虫的寄生率最低,基本没有寄生。对同一寄主龄期幼虫,寄主密度越大,寄生率越低。以 3 龄幼虫为例,寄主密度为 10 头/瓶时,寄生率为 90.00%,当寄主密度为 40 头/瓶时,寄生率为 55.00%。

表 2 淡足侧沟茧蜂对不同龄期草地贪夜蛾幼虫的寄生率

寄主虫态		寄生率 (%) Parasitic rate (%)							
Different instars larvae									
		10 头/瓶	10 ind./bottle	20 头/瓶	20 ind./bottle	30 头/瓶	30 ind./bottle	40 头/瓶	40 ind./bottle
1 龄幼虫	1st larvae	3.33±6.15hi		3.33±4.31ghi		1.11±3.50i		1.67±3.03hi	
2 龄幼虫	2nd larvae	73.33±2.22abc		60.00±1.69cd		54.44±0.64cd		44.17±0.48de	
3 龄幼虫	3rd larvae	90.00±7.86a		86.67±1.45ab		66.67±1.17bcd		55.00±0.83cd	
4 龄幼虫	4th larvae	23.33±2.22ef		18.33±1.26efg		12.10±0.99fgh		10.83±1.60fghi	

表中数据为平均值±标准误,同行数据后标有不同小写字母表示经方差分析存在显著性差异 ($P<0.05$, Tukey's 检验)。表 3 同。

Data in the table are mean ± SE, and followed by different small letters in the same line indicate significant differences after analysis of variance ($P<0.05$, Tukey's test). The same as table 3.

2.2 草地贪夜蛾两个 PPO 基因的时空表达分析

单因素方差分析表明,草地贪夜蛾幼虫不同发育时期的 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 基因的相对表达量均呈现显著差异 (*SfPPO1*: $F_{8,18}=356.83$, $P<0.000\ 1$; *SfPPO2*: $F_{8,18}=437.81$, $P<0.000\ 1$)。 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 基因在草地贪夜蛾卵期的相对表达量均为最高,分别为 26.39 和 199.78 (以

SfPPO1 在 1 龄幼虫中的表达量为 1), 其次是 4 龄和 3 龄幼虫,在蛹中的相对表达量最低(图 1)。

两因素方差分析表明,草地贪夜蛾幼虫中 *SfPPOs* 基因的相对表达量(以 *SfPPO1* 在血淋巴中的表达量为 1)受到不同 *PPO* 基因 ($F_{1,20}=140.77$, $P<0.000\ 1$)、不同组织 ($F_{4,20}=243.56$, $P<0.000\ 1$) 和两个因素的共同影响 ($F_{4,20}=139.31$, $P<0.000\ 1$)。在图 2 中, *SfPPO1* 和 *SfPPO2*

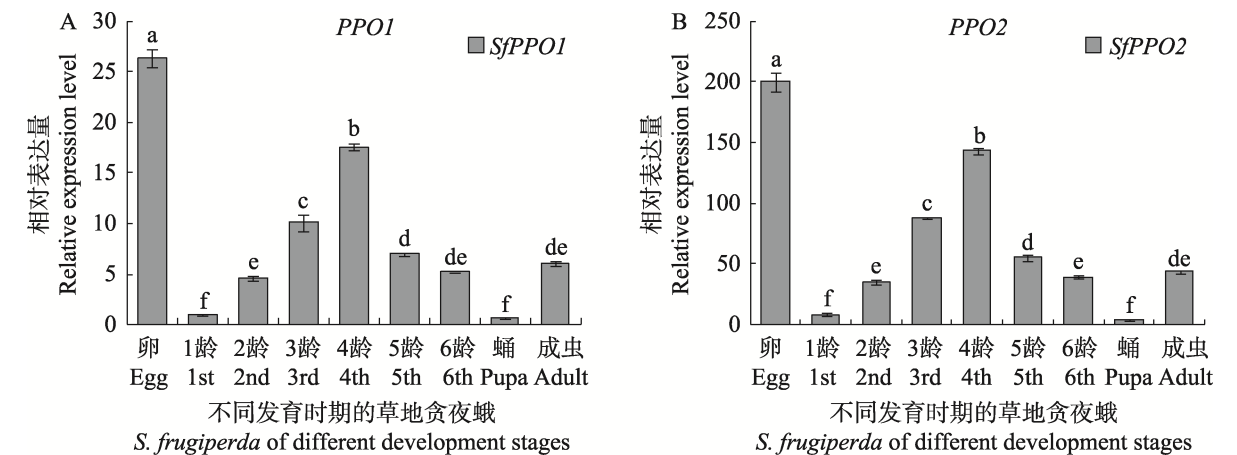


图 1 草地贪夜蛾两个 PPO 基因在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of two PPO genes in different developmental stages of Spodoptera frugiperda

A. 草地贪夜蛾不同发育时期 *SfPPO1* 基因相对表达量; B. 草地贪夜蛾不同发育时期 *SfPPO2* 基因相对表达量。
柱上标有不同小写字母表示经方差分析存在差异显著 ($P<0.05$, Tukey's 检验)。下同图。
A. Gene relative expression of *SfPPO1* in different developmental stages of *Spodoptera frugiperda*; B. Gene relative expression of *SfPPO2* in different developmental stages of *Spodoptera frugiperda*. Histograms with different small letters indicate significant differences after analysis of variance ($P<0.05$, Tukey's test). The same as below.

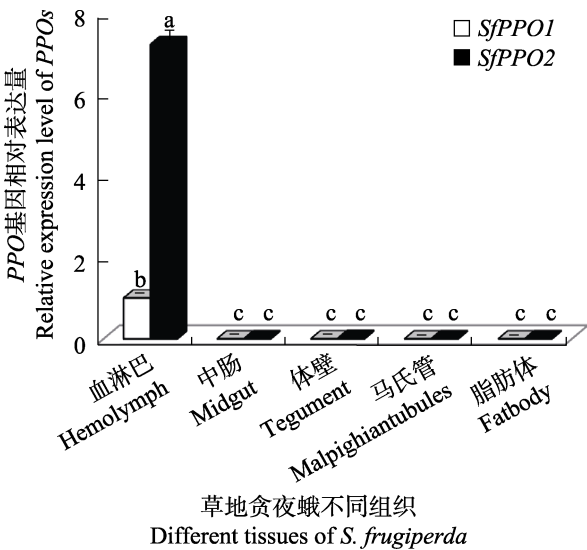


图2 草地贪夜蛾两个 PPO 基因在不同组织的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of two PPO genes in different tissues of *Spodoptera frugiperda*

基因的相对表达量在血淋巴中最高,显著高于其他 4 个组织中 PPO 基因相对表达量。而且, *SfPPO2* 基因的相对表达量为 *SfPPO1* 基因的相对表达量的 7.21 倍,存在显著差异。

2.3 淡足侧沟茧蜂寄生对草地贪夜蛾幼虫血淋巴黑化率的影响

从图 3 可以看出,未寄生组的草地贪夜蛾幼虫在处理各时间点的黑化率均达到 90%以上,而寄生组的草地贪夜蛾血淋巴黑化率在寄生后的 4 个时间点均显著低于未寄生组 (12 h: $t=74.459$, $df=2$, $P<0.05$; 24 h: $t=25.750$, $df=2$, $P<0.05$; 48 h: $t=27.300$, $df=2$, $P<0.05$; 72 h: $t=13.147$, $df=2$, $P<0.05$),且处理后 24 h 的黑化率最低 (22.50%), 48 h 的次之 (40.00%), 12 h 和

72 h 的黑化率相对较高,分别为 56.00%和 66.00%。

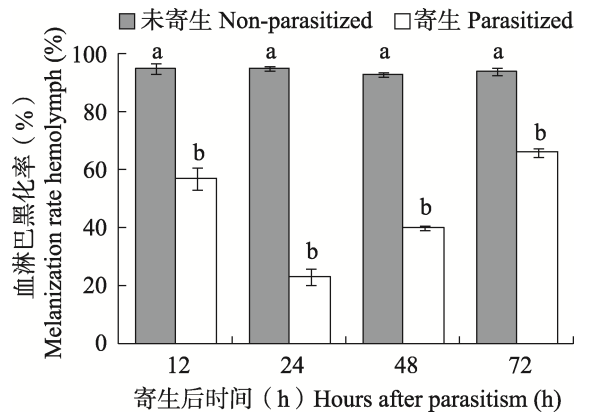


图3 草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生后的血淋巴黑化率
Fig. 3 Melanization rate of hemolymph of *Spodoptera frugiperda* after parasitized by *Microplitis pallidipes*

2.4 淡足侧沟茧蜂寄生对草地贪夜蛾幼虫 PO 活性的影响

在表 3 中,两因素方差分析表明,草地贪夜蛾血淋巴的酚氧化酶活性取决于是否被寄生 ($F_{1,16}=17.16$, $P=0.0008$)、处理后时间 ($F_{3,16}=5.91$, $P=0.0065$) 以及两个因素的共同影响 ($F_{3,16}=1.46$, $P=0.2723$)。草地贪夜蛾幼虫血淋巴的 PO 活性在被淡足侧沟茧蜂寄生后的 4 个时间点 (12、24、48 和 72 h) 均低于未被寄生蜂寄生的幼虫。在寄生之后 12 h,寄生组与未寄生组的 PO 活性差异尚不显著(分别为 72.65 ng/mL 和 73.71 ng/mL);而在寄生后 24-72 h,寄生组草地贪夜蛾的酶活性显著低于未寄生组,其中,在处理 72 h,未寄生组的 PO 活性最高,为 88.09 ng/mL,而被寄生幼虫的血淋巴 PO 活性仅为 77.81 ng/mL。

表 3 草地贪夜蛾幼虫被淡足侧沟茧蜂寄生后的酚氧化酶活性测定
Table 3 Determination of the phenoloxidase activity of *Spodoptera frugiperda* larvae after being parasitized by *Microplitis pallidipes*

寄主幼虫处理 Treatments of host larvae	酚氧化酶活性 (ng/mL) Phenoloxidase activity (ng/mL)			
	寄生后 12 h 12 h after parasitism	寄生后 24 h 24 h after parasitism	寄生后 48 h 48 h after parasitism	寄生后 72 h 72 h after parasitism
未寄生幼虫 Non-parasitized larvae	73.71±0.28bc	80.22±2.37abc	84.20±3.55ab	88.09±5.43a
寄生幼虫 Parasitized larvae	72.65±0.79bc	71.00±1.15c	75.23±0.84bc	77.81±0.61abc

2.5 淡足侧沟茧蜂寄生对草地贪夜蛾幼虫 *PPO* 基因相对表达量的影响

草地贪夜蛾 *SfPPOs* 基因的相对表达量取决于是否被寄生 (*SfPPO1*: $F_{1,16}=496.65$, $P<0.0001$; *SfPPO2*: $F_{1,16}=1\,912.85$, $P<0.0001$)、处理后时间 (*SfPPO1*: $F_{3,16}=845.66$, $P<0.0001$; *SfPPO2*: $F_{3,16}=953.40$, $P<0.0001$) 以及两个因素的共同影响 (*SfPPO1*: $F_{3,16}=50.59$, $P<0.0001$; *SfPPO2*: $F_{3,16}=103.83$, $P<0.0001$)。从图 4 可知, 寄生组与未寄生组 *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 的相对表达量均呈现先上升后下降的趋势。寄生组的草地贪夜蛾幼虫被淡足侧沟茧蜂寄生后 12-72 h, *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 的基因相对表达量均显著低于未被寄生的草地贪夜蛾幼虫。其中, 处理后 24 h, 未寄生组 *SfPPO1* 基因的相对表达量为寄生组的 10.04 倍; 处理后 12 h, 未寄生组 *SfPPO2* 基因生物相对表达量为寄生组的 11.67 倍。

2.6 *PPO* 基因相对表达量、PO 活性和黑化率的相关性分析

草地贪夜蛾被寄生后 *PPO* 基因相对表达量、PO 活性和黑化率的相关性分析结果表明(图 5), *SfPPO1* 的相对表达量 (X) 与 *SfPPO2* 的表达量 (Y) 呈现线性关系 ($Y=7.100\,7X - 0.600\,7$, $R^2=$

0.912 4), PO 活性、*PPO* 基因相对表达量和血淋巴黑化率 3 个指标之中, 两两之间均呈现正相关性。建立了两两指标间的相关性方程: PO (Y) - *SfPPO1* (X) ($Y=4.259\,3e^{0.013\,4X}$, $R^2=0.521\,5$)、PO (Y) - *SfPPO2* (X) ($Y=4.259\,5e^{0.002X}$, $R^2=0.635\,3$)、黑化率 (X) - *SfPPO1* (Y) ($Y=4.259\,5e^{0.002X}$, $R^2=0.635\,3$)、黑化率 (X) - *SfPPO2* (Y) ($Y=1.282\,8e^{1.878\,7X}$, $R^2=0.398\,5$)、黑化率 (X) - PO (Y) ($Y=4.241\,9e^{0.028\,8X}$, $R^2=0.399\,6$)。

3 讨论

寄主昆虫的酚氧化酶对外源入侵物的免疫反应与寄主和入侵物的种类密切相关。例如, 微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula* 的毒液能够显著下调菜粉蝶 *Pieris rapae* 血淋巴中 PO 的活性 (Asgari *et al.*, 2003)。双斑镶颚姬蜂 *Hyposoter didymator* 携带的病毒 (*Hyposoter didymator* Ichnovirus, HdIV) 能够上调草地贪夜蛾血淋巴中 *PPO* 基因的相对表达量, 而毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 携带的病毒 (*Microplitis demolitor* Bracovirus, MdBV) 能够下调草地贪夜蛾 *PPO* 基因的表达 (Provost *et al.*, 2011)。囊泡病毒 Ascoviruses 感染草地贪夜蛾 4 d 后, *SfPPO1* 和 *SfPPO2* 基因的相对表达量显著下调

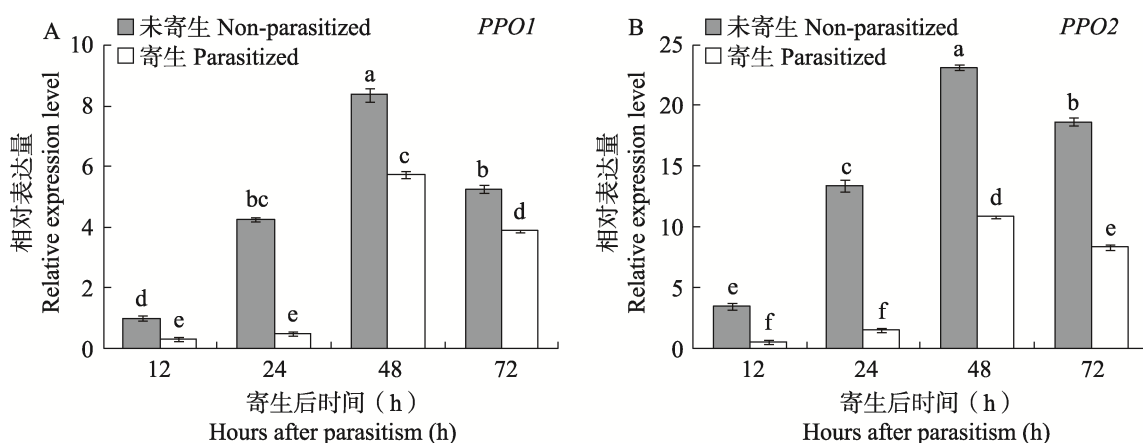


图 4 草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生后血淋巴 *PPO* 基因相对表达量

Fig. 4 Relative expression of two *PPO* genes of *Spodoptera frugiperda* after parasitized by *Microplitis pallidipes*

A. 草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生后血淋巴 *SfPPO1* 基因相对表达量;

B. 草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生后血淋巴 *SfPPO2* 基因相对表达量。

A. Relative gene expression of *SfPPO1* of *S. frugiperda* after parasitized by *M. pallidipes*;

B. Relative gene expression of *SfPPO2* of *S. frugiperda* after parasitized by *M. pallidipes*.

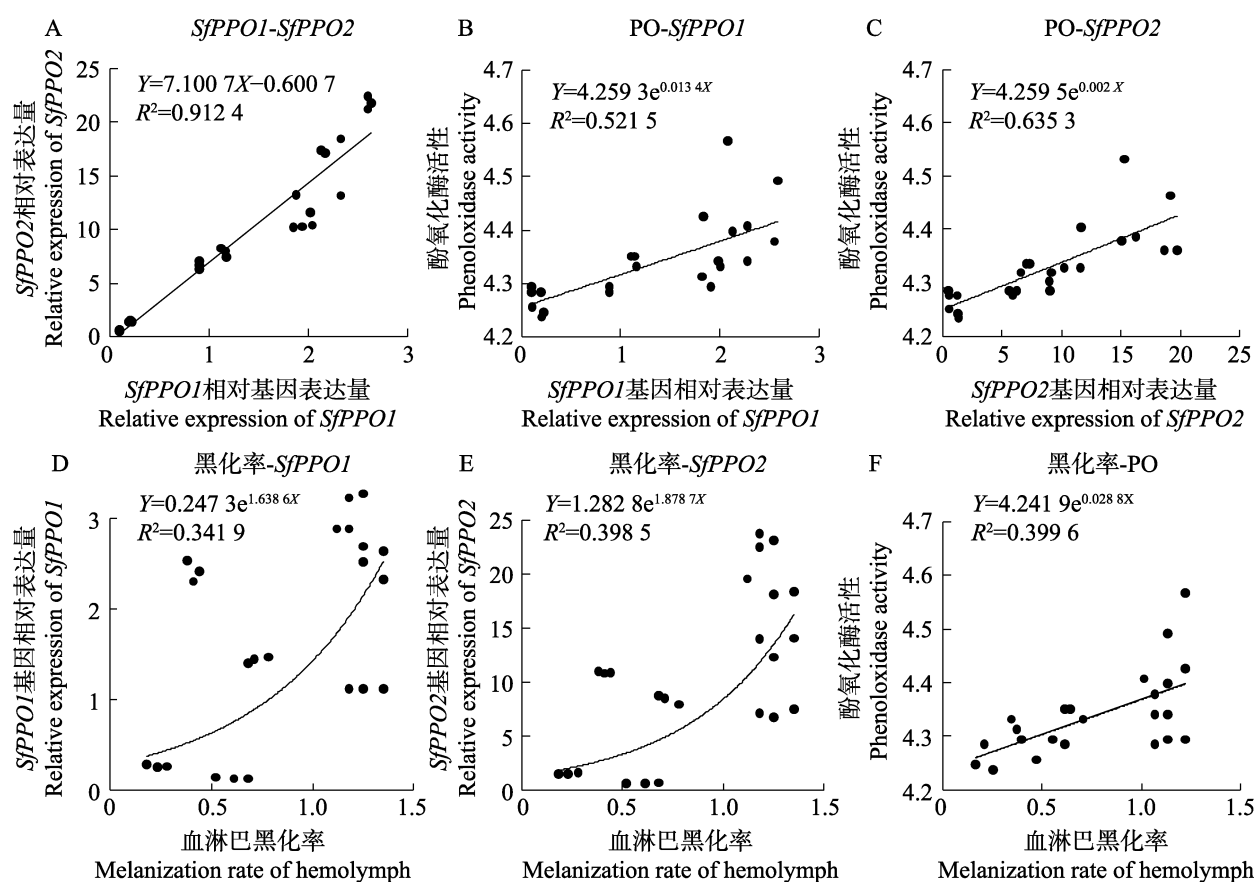


图5 草地贪夜蛾 *PPO* 基因相对表达量、*PO* 活性和血淋巴黑化率相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of *PPO* gene expression, *PO* activity and melanization rate of *Spodoptera frugiperda*

- A. *SfPPO1* 与 *SfPPO2* 基因相对表达量的相关性; B. *PO* 活性与 *SfPPO1* 基因相对表达量的相关性;
C. *PO* 活性与 *SfPPO2* 基因相对表达量的相关性; D. 血淋巴黑化率与 *SfPPO1* 基因相对表达量的相关性;
E. 血淋巴黑化率与 *SfPPO2* 基因相对表达量的相关性; F. 血淋巴黑化率与 *PO* 活性的相关性。

图中酚氧化酶活性数值进行对数转换, 黑化率数值进行反正弦转换。

- A. Correlation analysis of *SfPPO1* and *SfPPO2* gene expression; B. Correlation analysis of *PO* activity and *SfPPO1* gene expression; C. Correlation analysis of *PO* activity and *SfPPO2* gene expression;
D. Correlation analysis of melanization rate of *Spodoptera frugiperda* and *SfPPO1* gene expression;
E. Correlation analysis of melanization rate of *Spodoptera frugiperda* and *SfPPO2* gene expression;
F. Correlation analysis of melanization rate of *Spodoptera frugiperda* and *PO* activity. The phenoloxidase activity values are logarithmically transformed, and the melanization rate value is arcsine transformed.

(Zaghloul *et al.*, 2020)。冯从经等 (2004) 发现腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 寄生能够下调亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫的酚氧化酶活性。与此相反的是, 二化螟盘绒茧蜂 *Cotesia chilonis* 能够上调寄主二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫的酚氧化酶活性 (李秀花等, 2011)。这表明了寄主的酚氧化酶的免疫应答会因为与寄主和外源物的种类的不同而存在差别。

我们的研究结果发现, 淡足侧沟茧蜂的寄生能够抑制草地贪夜蛾的黑化反应。这可能是淡足侧沟茧蜂毒液中的毒液蛋白、多分 DNA 病毒和畸形细胞等与寄主的酚氧化酶基因或者上游基因酚氧化酶原激活酶 (Prophenoloxidase activating proteinase, PAP) 互作, 影响了酚氧化酶基因的表达, 并进一步影响其酶活 (Moreau and Guillot, 2005)。除此之外, 我们的研究结果还发现, 淡

足侧沟茧蜂的寄生能够抑制草地贪夜蛾的黑化反应,这也与齿唇姬蜂 *Campoletis chloridae* 能够抑制寄主棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 黑化率的研究结果一致。而酚氧化酶作为昆虫黑化反应通路上的关键酶,我们推测淡足侧沟茧蜂正是通过抑制了寄主的酚氧化酶,从而进一步影响寄主的黑化反应。

对 *PPO* 基因相对表达量、*PO* 活性和血淋巴黑化率进行相关性分析的结果表明, *PO* 活性、*PPO* 基因相对表达量和血淋巴黑化率 3 个指标之中,两两之间均呈现正相关性。而且 *PPO1* 和 *PPO2* 的表达量存在线性关系,二者在 mRNA 水平的正相关表明这两个 *PPO* 基因可能协同工作 (Zheng *et al.*, 2013)。与烟草天蛾 *Manduca sexta* 两个 *PPO* 基因的高序列一致性类似 (48%), 草地贪夜蛾的 *PPO1* 和 *PPO2* 的高序列一致性 (56%) 表明它们属于同源亚基 (Li *et al.*, 2009)。另外,我们的研究发现, *PPO2* 的表达水平高于 *PPO1* 的表达水平,这可能是由于草地贪夜蛾酚氧化酶的合成过程中 *PPO1* 和 *PPO2* 两个亚基的折叠和修饰存在差异,也可能是因为 *PPO2* 在草地贪夜蛾体内具有除了合成酚氧化酶之外的其他功能。除此之外,我们的研究表明, *PO* 活性和 *PPO* 基因相对表达量以及黑化率和 *PO* 活性及 *PPO* 基因相对表达量之间虽然表现为正相关,但是却不是线性相关。这表明 *PPO* 在转录后有一个复杂的修饰和激活过程才能进一步形成蛋白质三级结构 (杨伟克等, 2019, 2020)。而黑化反应也是受到其他多种酶 (酚氧化酶激活酶和多巴胺脱羧酶等) 的影响,虽然 *PPO* 基因是黑化反应通路上的关键酶,但是仍然不是黑化的唯一决定因素,因此它们之间不存在线性关系。

本研究在确定了草地贪夜蛾被淡足侧沟茧蜂寄生的最佳龄期和分析了 *PPO* 基因的时空表达谱的基础上,明确了淡足侧沟茧蜂对草地贪夜蛾血淋巴的黑化反应、*PPO* 基因相对表达量和 *PO* 活性的影响,并通过相关性分析研究了三者之间的关联性。研究结果对于更好的利用淡足侧沟茧蜂防控草地贪夜蛾和减少化学农药的使用具有重要意义。

参考文献 (References)

- Asgari S, Zhang GM, Zareie R, Schmidt O, 2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10): 1017–1024.
- Cerenius L, Soderhall K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1): 116–126.
- Chen H, Yang XL, Chen AD, Li YC, Wang DH, Liu J, Hu G, 2020. Immigration timing and origin of the first fall armyworms (*Spodoptera frugiperda*) detected in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(6): 1270–1278. [陈辉, 杨学礼, 谌爱东, 李永川, 王德海, 刘杰, 胡高, 2020. 我国最早发现为害地草地贪夜蛾的入侵时间及其虫源分布. 应用昆虫学报, 57(6): 1270–1278.]
- Chen XY, Shi M, Chen XX, 2015. The prophenoloxidase activating proteinase in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 281–288. [陈晓宇, 时敏, 陈学新, 2015. 昆虫酚氧化酶原激活酶研究. 应用昆虫学报, 52(2): 281–288.]
- Doucet D, Cusson M, 1996. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. *Comparative Biochemistry and Physiology A Physiology*, 114(4): 311–317.
- Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B, 2015. *Drosophila* innate immunity: Regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biology*, 13(1): 81.
- Feng CJ, Qiu HG, Qiu ZL, Fu WJ, 2004. Effects of parasitism by *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) on the activity of phenoloxidase in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 47(3): 298–304. [冯从经, 邱鸿贵, 邱中良, 符文俊, 2004. 腰带长体茧蜂寄生对亚洲玉米螟幼虫体内酚氧化酶活性的影响. 昆虫学报, 47(3): 298–304.]
- Guo JF, He KL, Wang ZY, 2019. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategy for management of the pest. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(3): 361–369. [郭井菲, 何康来, 王振营, 2019. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策. 应用昆虫学报, 56(3): 361–369.]
- Huang HY, Liu YN, Qi YF, Xu YY, Chen ZZ, 2020. Predatory responses of *Chrysoperla sinica* (Tjeder) larvae to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) eggs and larvae. *Chinese Journal of*

- Applied Entomology*, 57(6): 1333–1340. [黄海艺, 刘亚男, 亓永凤, 许永玉, 陈珍珍, 2020. 中华通草蛉幼虫对草地贪夜蛾卵和低龄幼虫的捕食作用. *应用昆虫学报*, 57(6): 1333–1340.]
- Huang LH, Christensen BM, Chen CC, 2001. Molecular cloning of a second prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus*: Prophenoloxidase expression in bloodfed and microfilariae-inoculated mosquitoes. *Insect Molecular Biology*, 10(1): 87–96.
- Jiang JX, Yang JH, Ji XY, Zhang H, Wan NF, 2018. Experimental temperature elevation promotes the cooperative ability of two natural enemies in the control of insect herbivores. *Biological Control*, 117: 52–62.
- Ji XY, Yin YY, Wan NF, Jiang JX, 2017. The effect of parasitization by *Microplitis pallidipes* Szépligeti on the activities of protective and immune enzymes in the hemolymph of larval *Spodoptera exigua* (Hübner). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(2): 214–220. [季香云, 印杨毅, 万年峰, 蒋杰贤, 2017. 淡足侧沟茧蜂寄生对甜菜夜蛾幼虫血淋巴保护酶和免疫酶的影响. *应用昆虫学报*, 54(2): 214–220.]
- Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Soderhall K, Lee BL, 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42): 39999–40004.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Li XH, Yao HW, Ye GY, 2011. Effects of parasitization by *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) on larval immune responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection*, 38(4): 313–319. [李秀花, 姚洪渭, 叶恭银, 2011. 二化螟盘绒茧蜂寄生对寄主二化螟幼虫免疫反应的影响. *植物保护学报*, 38(4): 313–319.]
- Li YC, Wang Y, Jiang HB, Deng J, 2009. Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4): 17002–17006.
- Lourenço AP, Zufelato MS, Bitondi MMG, Simões ZP, 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6): 541–552.
- Meng E, 2017. The parasitic factors of *Tetrastichus brontispae* during egg stage and their inhibitory effects on the host immune response of *Octodonta nipae* pupae. Doctoral dissertation. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University. [孟娥, 2017. 椰扁甲啮小蜂卵期寄生因子特性及其对寄主水椰八角铁甲蛹的免疫抑制作用. 博士学位论文. 福建: 福建农林大学.]
- Moreau SJM, Guillot S, 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(11): 1209–1223.
- Nappi AJ, Christensen BM, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(5): 443–459.
- Provost B, Jouan V, Hilliou F, Delobel P, Bernardo P, Ravallec M, Volkoff AN, 2011. Lepidopteran transcriptome analysis following infection by phylogenetically unrelated polydnviruses highlights differential and common responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8): 582–591.
- Tang P, Wang ZZ, Wu Q, Liu YQ, Shi M, Huang JH, Chen XX, 2019. The natural enemies of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and their application in biological control programs. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(3): 370–381. [唐璞, 王知知, 吴琼, 刘银泉, 时敏, 黄健华, 陈学新, 2019. 草地贪夜蛾的天敌资源及其生物防治中的应用. *应用昆虫学报*, 56(3): 370–381.]
- Tsao IY, Lin US, Christensen BM, Chen CC, 2009. *Armigeres subalbatus* prophenoloxidase III: Cloning, characterization and potential role in morphogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2): 96–104.
- Wang JY, Wan NF, Fan NN, Jiang JX, 2020. Functional response of *Microplitis pallidipes* parasitizing *Spodoptera frugiperda*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(6): 1319–1325. [王金彦, 万年峰, 范能能, 蒋杰贤, 2020. 淡足侧沟茧蜂对草地贪夜蛾的寄生功能反应. *应用昆虫学报*, 57(6): 1319–1325.]
- Wu KM, 2020. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China. *Plant Protection*, 46(2): 1–5. [吴孔明, 2020. 中国草地贪夜蛾的防控策略. *植物保护*, 46(2): 1–5.]
- Wu YD, Shen HW, Zhang Z, Wang XL, Shi Y, Wu SW, Yang YH, 2019. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and counter measures to prevent its development. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 599–604. [吴益东, 沈慧雯, 张正, 王兴亮, 施雨, 武淑文, 杨亦桦, 2019. 草

- 地贪夜蛾抗药性概况及其治理对策. 应用昆虫学报, 56(4): 599–604.]
- Yang WK, Liu ZH, Zhong J, Dong ZP, 2019. Variation of activity of phenoloxidase and its gene expression in hemolymph of *Bombyx mori* larvae during molting stage. *Journal of Southern Agriculture*, 50(2): 391–396. [杨伟克, 刘增虎, 钟健, 董占鹏, 2019. 家蚕眠期血淋巴酚氧化酶活性变化及其基因表达分析. 南方农业学报, 50(2): 391–396.]
- Yang WK, Tang FF, Liu ZH, Dong ZP, 2020. Effects of insect hormone on activity of phenoloxidase and its gene expression in hemolymph and integument of *Bombyx mori*. *Journal of Southern Agriculture*, 51(10): 2573–2579. [杨伟克, 唐芬芬, 刘增虎, 董占鹏, 2020. 昆虫激素对家蚕血淋巴和体壁酚氧化酶活性及其基因表达水平的影响. 南方农业学报, 51(10): 2573–2579.]
- Yang YJ, Xu HX, Hu Y, Han HL, Qin JN, Yin C, Lv ZX, 2020. Growth development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* reared on an artificial diet. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(6): 1341–1344. [杨亚军, 徐红星, 胡阳, 韩海亮, 钱佳宁, 殷琛, 吕仲贤, 2020. 人工饲料饲养草地贪夜蛾的生长发育与繁殖. 应用昆虫学报, 57(6): 1341–1344.]
- Yan WJ, Yang S, Wang YQ, Zheng Q, Zhang ZX, Xu HH, 2019. Comparison of the effectiveness of chemical and biological agents for the emergency control of *Spodoptera frugiperda* in the field. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 788–792. [闫文娟, 杨帅, 王勇庆, 郑群, 张志祥, 徐汉虹, 2019. 草地贪夜蛾应急防控药剂田间药效筛选. 应用昆虫学报, 56(4): 788–792.]
- Ye GY, Hu J, Zhu JY, Fang Q, Yan ZC, Wang L, 2019. Recent advances in research on the mechanisms through which parasitoid wasps regulate host immunity and development. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(3): 382–400. [叶恭银, 胡建, 朱家颖, 方琦, 严智超, 王磊, 2019. 寄生蜂调控寄主害虫免疫与发育机理的研究新进展. 应用昆虫学报, 56(3): 382–400.]
- Yin LH, Wang CZ, Qin JD, 2001. Effect of *Campoplex chorideae* on *Helicoverpa armigera* hemolymph phenoloxidase. *Chinese Science Bulletin*, 46(15): 1303–1307. [尹丽红, 王琛柱, 钦俊德, 2001. 棉铃虫齿唇姬蜂对棉铃虫血淋巴酚氧化酶的影响. 科学通报, 46(15): 1303–1307.]
- Zaghloul H, Hice R, Bideshi DK, Arensburger P, Federici BA, 2020. Mitochondrial and innate immunity transcriptomes from *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the *Spodoptera frugiperda* Ascovirus. *Journal of Virology*, 94(9): e01985-19.
- Zheng HZ, Li LS, Xu Q, Zou Q, Tang B, Wang S, 2013. Gene cloning and expression patterns of two prophenoloxidases from *Catantops pinguis* (Orthoptera: catantopidae). *Bulletin of Entomological Research*, 103(4): 393–405.