

温度对不同发育阶段东亚飞蝗酚氧化酶活性的影响*

赵卓^{1**}, 李校堃², 金立波², 任炳忠³

1. 吉林师范大学生命科学学院, 四平 136000; 2. 吉林农业大学教育部生物反应器与药物开发工程研究中心, 长春 130118; 3. 东北师范大学生命科学学院, 长春 130062

摘要: 为比较昆虫发育时期免疫防御能力的强弱, 对不同发育时期东亚飞蝗体外酚氧化酶活性动态变化进行了测定和比较分析。结果显示: 从东亚飞蝗不同发育时期看, 1~5 龄蝗蛹及雄成虫 25 °C 时酚氧化酶活性达到峰值, 雌成虫 30 °C 时酚氧化酶活性达到峰值, 雌虫酶活性高于雄虫; 不同温度作用下, 1~5 龄蝗蛹在 15~45 °C 温度变化中变化规律相似, 1 龄蝗蛹酶活性最低, 2~4 龄蝗蛹时期酶活性升高, 5 龄蝗蛹时酶活性达到峰值, 成虫酶活性在 30 °C 和 45 °C 时, 雌虫酶活性高于雄虫 ($P < 0.05$)。东亚飞蝗不同发育时期、不同温度作用下酚氧化酶活性动态变化显示了其免疫能力的强弱差异。

关键词: 东亚飞蝗; 酚氧化酶; 发育; 动态变化

中图分类号: Q965

文献标识码: A

文章编号:

DOI: CNKI:22-1100/S.20110920.1434.003

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110920.1434.003.html>

Temperature Effect on Phenoloxidase Activity in Different Stage of *Locusta migratoria manilensis* Meyen

ZHAO Zhuo¹ · LI Xiao-kun² · JIN Li-bo² · REN Bing-zhong³

1. College of Life Sciences, Jilin Normal University, Siping 136000, China; 2. Ministry of Education, Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. College of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130062, China

Abstract: To compare the immunity in developmental stage of insect, the dynamics of phenoloxidase activity in vitro during differently developmental stage of *Locusta migratoria manilensis* Meyen were tested and analyzed. The results showed as follow: During the development, the phenoloxidase activity arrived at the highest under 25 °C but it in female adults attained to peak at 30 °C. Under different temperature, there were similar changes from 1st to 5th larvae. There were the lowest phenoloxidase activity in the 1st larvae and the highest phenoloxidase activity in the 5th larvae. In adult, the phenoloxidase activity in female adult were higher than that in male adult under 30 °C 和 45 °C. The result showed that the dynamic of phenoloxidase activity of *Locusta migratoria manilensis* Meyen during different developmental stages under different temperature proved the difference of immunocompetent and provided the references for the target on phenoloxidase activity to develop biological insecticide.

Key words: *Locusta migratoria manilensis* Meyen; phenoloxidase; development; dynamic

酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 参与多种重要的生理功能^[1-2]。与高等脊椎动物比较而言, 昆虫属于较低等动物类群, 除简单的身体结构外, 其体内免疫系统亦不如脊椎动物完善。昆虫主要通过体液免疫执行防御反应,

如吞噬作用、结节形成、包囊产生、合成抗菌肽、黑化现象等^[3], 酚氧化酶在昆虫体液免疫反应中发挥着重要的作用, 它以没有活性的酚氧化酶原 (ProPO) 的形式存在于血淋巴中, 通过 β -1,3-葡聚糖、脂多糖、肽聚糖和酵母聚糖等激活丝氨酸蛋白酶原, 从而引发

* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (201105087), 农业公益性行业科技项目 (200903021)

作者简介: 赵卓, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 昆虫发育生物学。

收稿日期: 2010-10-23

网络出版时间: 2011-09-20 14:34

** 通讯作者

丝氨酸蛋白酶的级联反应激活ProPO^[4]。在ProPO级联反应中，ProPO经过限制性水解作用去掉1个肽链而形成有活性的PO，催化黑色素的产生。此外，昆虫在生长发育过程中具有周期性蜕皮形成的新表皮，表皮组织通过柔化和暗化作用加黑变硬，其中酚氧化酶参与这些重要的生理反应，它把表皮中的酚类衍生物氧化为醌类物质，并与表皮中的蛋白质分子发生交联，形成不溶性的鞣化蛋白，从而使表皮变硬，醌类化合物也可聚合形成黑色素，从而使表皮颜色加深^[5-6]。正是由于酚氧化酶与昆虫体内多种生理过程密切相关，近年来对昆虫体内酚氧化酶活性以及抑制剂研究较多，特别是为研制全新的、专化性的无公害害虫控制剂提供理论与实践参考^[7-12]。文中以东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis* Meyen)为试验对象，研究其不同发育时期温度对酚氧化酶活性的影响，探索不同发育时期不同温度作用下该酶的表达规律，旨在为开发以酚氧化酶为靶标的生物型杀虫剂提供生理水平的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

东亚飞蝗卵培养于湿沙土中，置于恒温光照培养箱光照培养[14h/10h(光/暗)]，30℃繁育各龄期蝗蝻及成虫。

1.2 酶液制备

不同发育时期蝗虫酚氧化酶制备：取各发育时期蝗虫10头，加入预冷的0.02 mol/L (pH6.9) PBS，按质量比1:9冰浴匀浆。匀浆液在4℃、4000 r/min条件下离心20 min，取上清作为待测酶液。

1.3 各发育时期酶液不同温度处理

取东亚飞蝗不同发育时期待测酶液0.5mL 分别放入15, 20, 25, 30, 35, 40, 45℃水浴中作用30min后，进行酶活力测定。

1.4 酚氧化酶活力测定

向1.5 mL L-DOPA(0.05mol/L)溶液中加入1.4 mL的0.02 mol/L磷酸缓冲液，30℃水浴中作用30 min后，加入0.1 mL待测酶液混匀，测定475 nm波长下OD值，以双蒸水调零。OD值大说明酚氧化酶活性高，OD值小说明酚氧化酶活性低。蛋白质含量采用G-250考马斯亮蓝法测定^[13]。

1.5 数据统计与分析

实验所得数据用SPSS软件进行ANOVA分析，图中数据采用Mean±SE表示，显著水平P<0.05。

2 结果与分析

2.1 温度对不同发育时期东亚飞蝗酚氧化酶活性变化的影响

东亚飞蝗酚氧化酶活性在不同温度下出现动态变化(图1)。1~4龄蝗蝻15℃和20℃时酶活性较低且差异不显著，25℃时酶活性最高，高于30℃时酶活性逐渐降低，40℃后酶活性显著降低。5龄蝗蝻15℃时酶活性较低，20℃时酶活性升高，25℃酶活性达到峰值，温度升至30~40℃时酶活性降低，45℃降至最低。雌性成虫15~25℃酶活性较低，30℃酶活性升高达到峰值，35℃后显著降低，40℃后降至最低。雄性成虫15~20℃酶活性较低，25℃酶活性升高达到峰值，30℃后温度每升高5℃酶活性都显著降低(P<0.05)。比较成虫酶活性，雌虫酶活性显著高于雄虫，且随温度变化酶活性表现出不同的动态变化。

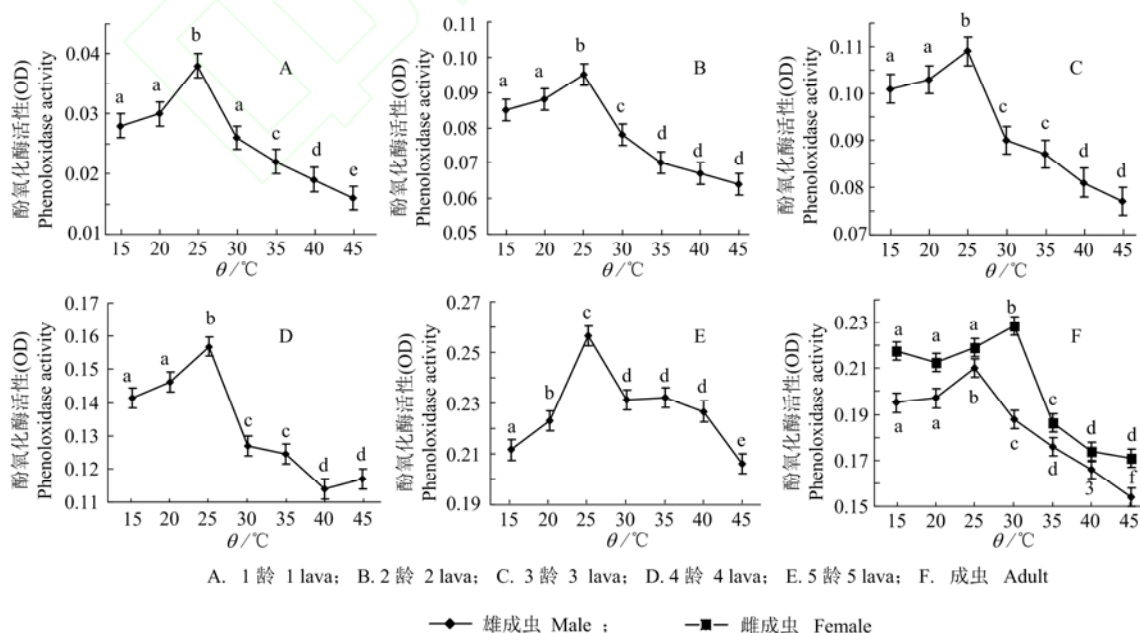


图1 温度对不同发育时期东亚飞蝗酚氧化酶活性的影响

Fig.1. Dynamic of phenoloxidase activity under different temperature in different developmental stage of *Locusta*

migratoria manilensis Meyen.

2.2 不同发育时期在不同温度下东亚飞蝗酚氧化酶活性变化

从不同发育阶段的酚氧化酶活性看,东亚飞蝗不同发育时期表现出不同的差异(图2)。1~5龄蝗蛹在

15~45℃温度变化中变化规律相似,1龄蝗蛹酶活性最低,2~4龄蝗蛹时期酶活性升高,5龄蝗蛹时酶活性达到峰值,甚至超过成虫时期酶活性。成虫酶活性在30℃和45℃时,雌虫酶活性高于雄虫。

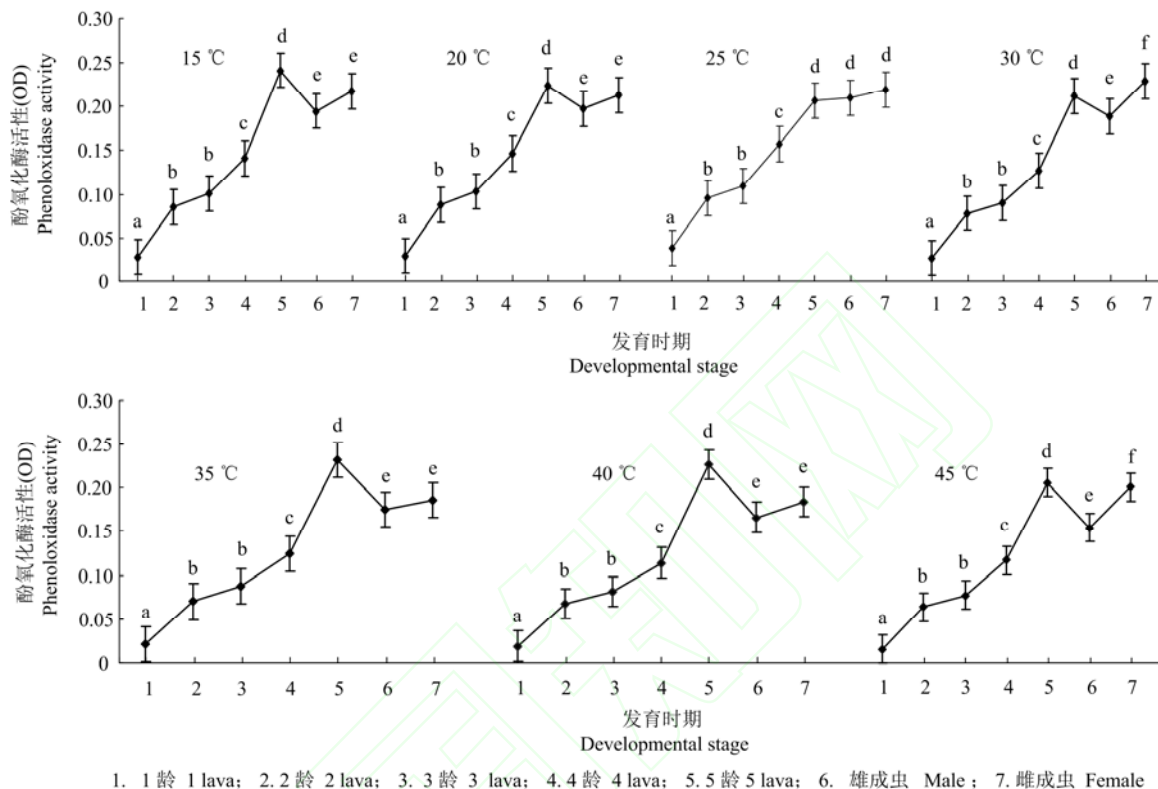


图2 不同发育时期在不同温度下的东亚飞蝗酚氧化酶动态变化

Fig.2. Dynamic of phenoloxidase activity in different developmental stage of *Locusta migratoria manilensis* Meyen under different temperature

3 结论

酚氧化酶作为昆虫体内非特异性免疫的重要执行者,生理活性及环境因子对其影响都决定着昆虫对外界环境的抵御能力^[14]。本试验研究不同发育时期东亚飞蝗酚氧化酶生理活性动态变化及温度变化对其影响程度,从而反映出东亚飞蝗在不同发育时期及不同温度作用下自身免疫能力的强弱。

从东亚飞蝗不同发育时期酚氧化酶动态变化来看,东亚飞蝗幼虫时期免疫能力很弱,尤其是刚孵化出来的1龄蝗蛹最弱,在培养过程中亦发现1龄蝗蛹死亡率也较高,随着虫体发育和蝗蛹大量取食,2~4龄蝗蛹免疫能力逐渐升高,在5龄蝗蛹阶段其免疫能力基本达到成虫水平,说明低龄蝗蛹的免疫能力从亲本处获得不多,主要还是依靠后天取食后提升自身的免疫能力。在成虫阶段,雌虫免疫能力高于雄虫,推测雌虫为保障繁衍的顺利进行免疫能力较高。

昆虫属于变温动物,温度变化对身体发育及多种生理水平都有较大的影响和改变。通过温度梯度变化处理不同发育时期东亚飞蝗,检测到酚氧化酶均在25℃时有最高活性,在15~30℃范围内,酚氧化酶活性比较稳定,超过35℃后酶活性显著降低。该结果显示东亚飞蝗体内酚氧化酶活性受温度影响较大,在最适温度下虫体才有较强的免疫能力。

温度梯度变化后,不同发育时期东亚飞蝗体内酚氧化酶活性亦有所不同,1龄蝗蛹酚氧化酶活性最低,随着虫体的发育酚氧化酶活性逐渐升高,5龄蝗蛹酚氧化酶活性达到峰值且达到或超过成虫水平。总体来看,温度变化对东亚飞蝗不同发育时期的影响显著,低龄蝗蛹免疫能力很弱,而5龄蝗蛹经过营养的储备和身体机能的完善,其体内酚氧化酶活性接近甚至于超过成虫水平,证明进入5龄蝗蛹以后阶段的虫体无论温度怎样变化,其自身的免疫能力都是最强的。通过本研究得出结论,东亚飞蝗体内酚氧化酶活性在

5龄以后的虫体中最强,酚氧化酶均在25℃时有最高活性,在15~30℃有稳定活性。因此,在防治东亚飞蝗的时间和温度选择上,应尽量避免东亚飞蝗免疫能力最佳发育时期和最适温度,以达到最大最优的控害效果。

参考文献:

- [1] Ashida M, Kinoshita K, Braey P T. Studies on phenoloxidase activation in mosquito *Aedes aegypti* L.[J]. Eur J Biochem, 1990, 188: 507-515.
- [2] Li J, Christensen BM. Involvement of L-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1993, 23: 739-748.
- [3] 尹丽红, 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫血淋巴酚氧化酶活性的微量测定[J]. 昆虫知识, 2001, 38(2):119-122.
- [4] Sugumaran M, Kanost M R. Regulation of insect hemolymph phenoloxidases[M]//Beckage N E, Thomposon S N, Federici B A. Parasites and pathogens of insects. San Diego, Calif: Academic Press Inc, 1993: 317-342.
- [5] 刘守柱, 薛超彬, 罗万春. 黄粉虫幼虫体壁硬化过程中酚氧化酶活性的变化[J]. 昆虫学报, 2009, 52(9): 941-945.
- [6] 王荫长. 昆虫生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 7-38.
- [7] 冯从经, 邱鸿贵, 邱中良, 等. 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[J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 298-304.
- [8] 刘守柱, 肖婷, 薛超彬, 等. 槲皮素对黄粉虫血淋巴酚氧化酶的生理效应[J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1201-1206.
- [9] 张永亮, 贾永红, 朱勇. 家蚕胚胎各发育时期酚氧化酶原基因的转录活性分析[J]. 蚕学通讯, 2008, 28(2): 1-3.
- [10] 马志卿, 韩秀玲, 冯俊涛, 等. 松油烯-4-醇对粘虫几种代谢酶及酚氧化酶的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 437-442.
- [11] 刘伟, 肖婷, 杜磊, 等. 牛耳枫提取物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3720-3725.
- [12] 罗万春, 薛超彬. 昆虫酚氧化酶及其抑制剂[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [13] 肖婷, 刘守柱, 薛超彬, 等. 紫外分光光度法与酶标仪微量法测定酚氧化酶蛋白含量及活力的比较[J]. 昆虫知识, 2008, 45(2): 306-309.
- [14] 陈文柱, 李兵, 贡成良, 等. 酚氧化酶在家蚕血淋巴中的活力分布及影响因素的研究[J]. 江苏蚕业, 2005(2): 12-15.