

# 绿僵菌侵染对黏虫免疫反应的影响

郭 栋, 张 蕾, 程云霞, 江幸福\*, 罗礼智

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 为揭示黏虫被病原菌侵染后的免疫应答机制, 本试验分析比较了黏虫幼虫被金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 侵染后不同时间其血淋巴蛋白含量、免疫关键酶系(酚氧化酶 PO, 溶菌酶)活性、抗菌活力以及血细胞数量等免疫相关指标的变化。结果表明: 受绿僵菌侵染后, 黏虫 6 龄幼虫血淋巴蛋白含量在侵染初期(6 h 和 24 h)显著高于对照, 侵染 48、72 和 96 h 后幼虫血淋巴蛋白含量显著低于对照。且侵染后幼虫血淋巴 PO 活性也呈现先升高后降低的趋势, 侵染初期(6 h 和 24 h)显著高于对照, 侵染后期除 72 h 外与对照组无显著差异。侵染初期(24 h)溶菌酶活性也显著升高, 随后出现下降, 并于 48 h 显著低于对照, 但在化蛹时(96 h)再次上升。绿僵菌侵染后期, 黏虫的抗菌活性下降, 于侵染后 72 h 抗菌活性显著低于对照, 而侵染初期抗菌活性与对照无显著差异。另外, 绿僵菌侵染对幼虫血细胞数量以及浆血细胞比率也有显著的影响, 表现为: 侵染后 6 h 和 24 h 血细胞总数、浆血细胞比率均显著高于对照, 随后与对照并无显著差异。综上, 绿僵菌侵染黏虫幼虫初期会显著诱导其免疫反应的启动, 体现在主要免疫指标升高, 而后随着免疫系统的破坏与能量的消耗, 其免疫反应能力降低, 生理活动受到干扰。

**关键词** 黏虫; 金龟子绿僵菌; 免疫反应

**中图分类号:** S 476.12 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017132

## Influences of *Metarhizium anisopliae* infection on the immune response of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker)

GUO Dong, ZHANG Lei, CHENG Yunxia, JIANG Xingfu, LUO Lizhi

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** In order to reveal the immune response mechanism of *Mythimna separata* (Walker), the changes of hemolymph protein content, PO activity, lysozyme activity, antimicrobial activity and the number of blood cells in melanotic larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae* were studied. The results showed that the hemolymph protein content of larvae was significantly higher than that of the control at 6 h and 24 h after infection, but with the extension of time, the protein content in infected larvae was significantly lower than that in the control in 48 h, 72 h and 96 h. The PO activity increased at first and decreased subsequently, significantly higher than the control in 6 h, 24 h, then no significant difference from the control group (except for 72 h). In the early stage of infection (24 h), lysozyme activity also increased significantly, but in 48 h, was significantly lower than the control, and at the time of pupation (96 h), lysozyme activity rose again. Although the antibacterial activity increased in the early stage of infection, but no significant difference was observed compared to the control; the antibacterial activity fell in the late stage, and significantly lower than the control in 72 h. The infection of *Metarhizium anisopliae* also had a significant effect on the number of hemocytes and the ratio of plasma cells in melanotic larvae. In 6 h and 24 h after infection, the total blood cells and plasma cells were significantly higher than those of the control, but then the difference disappeared. These results suggested that *Metarhizium anisopliae* infection could significantly induce the larval immune response in the early stage, mainly reflected in the rise of major immune index. With the destruction of the immune system and energy consumption, the larval im-

收稿日期: 2017-04-09 修订日期: 2017-06-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201403031, 201303057); 国家国际科技合作专项(2014DFR31250); 国家自然科学基金(31672019, 31371947, 31301656); 北京市自然科学基金(6142017)

\* 通信作者 E-mail: xfjiang@ippcaas.cn

mune ability began to decrease and the physiological activities were disturbed.

**Key words** *Mythimna separata*; *Metarhizium anisopliae*; immune response

昆虫在繁衍过程中会因为种种原因受到外界天敌寄生或病原物侵染,其正常的生长发育受到严重影响。而昆虫能在各种不同的外界环境中生存,与其自身的免疫反应有重要的关系。昆虫作为无脊椎动物,免疫系统以先天性免疫为主。与高等动物相比,昆虫体内缺乏更高等级的免疫球蛋白等免疫物质,但在长期的进化过程中发展出一套独特的防御系统来阻止外来生物的侵入。除坚硬的表皮、组织外,昆虫血淋巴系统在免疫机制中也承担着重要的作用,其中主要包括体液免疫和细胞免疫两大系统<sup>[1-3]</sup>。当昆虫受到外源病原物的刺激时,酚氧化酶(phenoloxidase, PO)可以参与昆虫表皮的硬化和黑化,从而支撑和保护虫体正常的生长发育;而当病原物进入虫体后,溶菌酶可以导致病原体细胞壁破裂并使内容物逸出,最终病原细胞破裂死亡<sup>[4]</sup>;抗菌肽是昆虫被病原菌感染后,虫体内快速产生的一种免疫诱导分子,对外源病原物具有强有力的杀伤作用;血淋巴细胞是昆虫细胞免疫的主要执行者,血细胞的种类和数量是细胞免疫反应的重要指标,免疫血细胞可对外源异物进行吞噬、形成结节、包被和血凝等,从而参与伤口的愈合、凝结、合成及分泌免疫相关因子<sup>[2,5]</sup>。因此,PO活性、溶菌酶活性、抗菌活力和免疫血细胞数量等免疫指标的变化是昆虫免疫反应的标志性参数<sup>[6]</sup>。这些免疫反应同时也会影响昆虫的资源分配并可能改变其行为或发育方向,从而影响种群动态<sup>[7-8]</sup>。

黏虫 *Mythimna separata* (Walker) 是一种典型的季节性远距离迁飞害虫,是严重威胁我国主要粮食作物生产安全的重大害虫<sup>[9-10]</sup>。黏虫发生范围广,为害世代多,除 2012 年和 2013 年连续在全国大发生外,近年来,在我国局部地区同样暴发成灾<sup>[11-13]</sup>。而在全中国开展的黏虫为害调查显示,幼虫表皮发生黑化可作为成灾种群典型的预警信息。黑化幼虫抵抗天敌和病原物入侵的能力明显增强,一些常用的生物制剂对其防治效果不明显。研究发现,黏虫幼虫黑化是一种典型的密度依赖型现象,黑化幼虫适应能力的增强主要体现在取食量大、抗逆能力增加和由其发育而来的成虫迁飞能力提高等方面,从而导致生产上为害更加严重<sup>[14-15]</sup>。近年研究也发现高密度饲养的幼虫表皮黑化程度明显高于单

头饲养的黏虫,较高密度饲养的黏虫(10 头/瓶)抵抗伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* Rondani 的寄生和绿僵菌侵染的能力明显增加,其 6 龄幼虫表皮和血淋巴酚氧化酶(PO)的活性也显著高于单头饲养的黏虫,这些结果初步明确了 PO 活性的增加是高密度幼虫黑化及抗病能力提高的关键因素<sup>[16]</sup>。然而,目前对黑化黏虫的研究多集中在生长发育和行为变化方面,关于黑化黏虫防御的免疫应答机制方面还未有报道。因此,本研究旨在通过绿僵菌侵染黑化黏虫 6 龄幼虫后测定其血淋巴蛋白质含量、PO 活性、溶菌酶活性、抗菌物质和血细胞数量等免疫指标的变化,揭示黑化黏虫的相关免疫反应,从而对指导和发展其生物防治提供重要数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株:金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sor 购自神威生物公司。

供试昆虫及饲养:在吉林采集的高龄黏虫,在实验室繁殖 6 代。在饲养密度为 10 头/瓶(直径 9 cm × 高 13 cm)条件下诱导出的黑化型黏虫<sup>[14]</sup>。幼虫饲养参照吕伟祥等室内人工饲养方法<sup>[17]</sup>,培养温度为(23±1)℃,光周期为 L//D=14 h//10 h,湿度为 70%~80%,饲料为 30~50 cm 高的新鲜玉米苗,每日更换饲料,直至幼虫老熟为止。幼虫老熟时瓶中加入含水量 10%~15%的土壤供其化蛹和羽化。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 绿僵菌侵染方法

根据白毓昕<sup>[16]</sup>的试验结果,10<sup>6</sup> cfu/mL 的孢子浓度可以激活黏虫 6 龄幼虫免疫反应且幼虫不会迅速死亡,故本试验接种用孢子悬浮液浓度设为 10<sup>6</sup> cfu/mL。用含 0.01%吐温-80 的无菌水配制该浓度的绿僵菌分生孢子悬浮液,将蜕皮 24 h 以内的黏虫 6 龄幼虫浸于孢子悬浮液中 5 s 后取出,放在吸水纸上吸干虫体表面水分,然后将其置于盛有新鲜玉米叶的养虫瓶中按 1.1 的方法继续饲养,以含 0.01%吐温-80 的无菌水浸泡虫体为对照。处理后每天更换新鲜叶片,去除死亡幼虫。每个处理重复 3 瓶,共 30 头。

### 1.2.2 黏虫血淋巴采集和粗酶液制备

参考陈文柱等<sup>[18]</sup>的方法,分别于侵染后 6、24、48、72 和 96 h 时采集血淋巴。将 6 龄幼虫放在冰面上使其暂时昏迷,用消毒解剖针刺破幼虫最后一对腹足,使血淋巴快速滴入 4℃ 预冷的离心管中。取 10 μL 血淋巴与 40 μL 抗凝血缓冲液(EDTA:pH=7.4)混匀用于血细胞观察计数。将剩余的血淋巴冰浴匀浆,加入少量苯基硫脲后 10 000 r/min 离心 5 min,上清液即为粗酶液,-20℃ 中保存待测。

### 1.2.3 血淋巴蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白含量<sup>[19]</sup>。以牛血清蛋白为对照。

标准曲线制作:蛋白标准品完全融化后,用 PBS 稀释液稀释至系列浓度。5×考马斯亮蓝 G-250 染色液使用前颠倒 3~5 次混匀,加入双蒸水稀释成 1×G-250 溶液。此新鲜配制的 1×G-250 溶液可在 4℃ 保存 7 d。

样品蛋白含量的测定:于相同酶标板中准确加入 10 μL 待测酶液,再加入 90 μL 蒸馏水,100 μL 考马斯亮蓝 1×G-250 试剂,充分混合,M200 酶标仪(TECAN)测定 595 nm 处吸光值。根据标准曲线,计算样品蛋白含量。

### 1.2.4 血淋巴免疫酶活力测定

酚氧化酶活力的测定参照白毓昕和 Wilson 等的方法进行<sup>[16,20]</sup>。取 1.2.2 制备的粗酶液 20 μL 加入 1 000 μL 预冷的 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液中,充分混合作为待测酶液。在 96 孔酶标板中首先加入 200 μL 15 mmol/L 的左旋多巴 L-DOPA,30℃ 水浴 10 min,然后加入 10 μL 待测酶液及 40 μL 0.1 mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液,振荡 10 s 混匀,迅速放入酶标仪中,检测 492 nm 下连续 10 min 内的 OD 值变化,每样品重复测量 3 次,计算 PO 活性。酶活力单位为 U,即在上述条件下,使吸光度值每分钟增加 0.001 所需要的酶量定义为一个酶活力单位<sup>[21]</sup>。

溶菌酶活力测定参照溶菌酶试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书进行,有改动。在 5 mg/支的菌粉匀浆管中加入 1 mL 菌粉溶剂即为贮备菌液。贮备菌液:菌粉溶剂=1:19 配制应用菌液,该应用菌液 2~8℃ 可保存 7 d。在 96 孔酶标板中设空白孔、标准孔和样品孔。每孔加入 200 μL 应用菌液,空白孔和标准孔分别加入 20 μL 双蒸水和

2.5 μg/mL 的溶菌酶标准应用液,样品孔加 20 μL 粗酶液,混匀。37℃ 温浴 15 min,取出后冰浴 3 min 以终止反应。测定 530 nm 处吸光值,计算溶菌酶含量,公式为  $U = (UT_{15} - OT_{15}) / (ST_{15} - OT_{15}) \times 200$ ,式中  $UT_{15}$  为样品透光度, $OT_{15}$  为空白透光度, $ST_{15}$  为标准透光度。酶活力单位为 U/mL。

### 1.2.5 抗菌活力的测定

抗菌活力的测定使用比浊法<sup>[22]</sup>。取对数生长期的大肠杆菌菌液,3 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,弃上清液,冰浴 3 min 后加 pH 为 6.5 的磷酸缓冲液稀释至  $OD_{570}$  为 0.3~0.5 之间;取粗酶液与菌液共育(1:10,V:V),以未加粗提液的菌液为对照,反应 30 min 后读取 570 nm 处吸光值,计算抗菌活力  $U = (OD - OD_0) / OD_0$ ,公式中  $U$  为抗菌活力单位, $OD_0$  为初始的吸光值,OD 为作用一定时间后的吸光值。

### 1.2.6 血细胞的计数

取 10 μL 血淋巴与 40 μL 抗凝血缓冲液(EDTA,pH=7.4)混匀用于血细胞计数。计数时取 5 μL 血淋巴与抗凝血缓冲液的混合液滴入血球计数板内,静置 2~3 min,在显微镜下观察计数,统计血细胞总数和浆血胞、粒血胞数量。根据公式计算被绿僵菌侵染后 6、24、48、72、96 h 后的黏虫幼虫血细胞总数、浆血胞、粒血胞的数目及占血细胞总数的百分比。

每毫升血淋巴中血细胞数 = (5 个大方格内总数/5) × 25 × 10<sup>4</sup> × 稀释倍数。

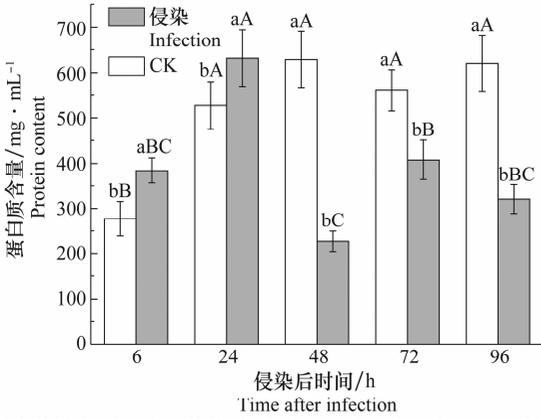
### 1.2.7 数据统计与分析

数据应用统计软件 SPSS 16.0 进行分析。同一处理不同时间的差异经方差分析差异显著后采用 Tukey's HSD 进行多重比较,同一时间下,侵染组与对照组间差异比较采用  $t$  测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿僵菌侵染对黏虫体内蛋白质含量的影响

对照组黏虫在正常发育过程中,幼虫血淋巴蛋白质含量在 24 h 时显著升高( $P < 0.05$ ),之后随着幼虫日龄的增加无明显变化( $P > 0.05$ );绿僵菌对黏虫幼虫血淋巴蛋白含量有显著的影响,其蛋白含量在侵染初期 6、24 h 显著高于对照( $P < 0.05$ )且在 24 h 达到最高峰,但随着时间的延长,蛋白含量急剧减少,侵染后 48、72 和 96 h 幼虫的血淋巴蛋白质含量显著低于对照( $P < 0.05$ )(图 1)。



图中数据为3次重复平均值±标准误;不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示不同侵染时间之间差异显著( $P<0.05$ )。下同

Data in the figure are means ± SE of three replicates. Different lowercase letters above bars indicate significant differences among different treatments at the same time ( $P<0.05$ ); different capital letters indicate significant difference among different infection times ( $P<0.05$ ). The same below

图1 绿僵菌侵染后黏虫血淋巴蛋白含量的变化

Fig. 1 Changes in hemolymph protein content in 6th-instar larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae*

## 2.2 绿僵菌侵染对黏虫体内酚氧化酶活性的影响

对照组黏虫正常发育过程中 PO 活性呈现降低-升高-降低的趋势,且在 72~96 h 时明显下降( $P<0.05$ )。绿僵菌侵染对其血淋巴 PO 活性有显著的影响( $P<0.05$ ),侵染后幼虫血淋巴 PO 活性呈现先升高后降低的趋势,侵染初期 6、24 h 显著高于对照( $P<0.05$ ),而在后期 48、96 h 则与对照组无显著差异( $P>0.05$ )。但被侵染后的黏虫 PO 活性整体显著高于对照组( $P<0.05$ )。

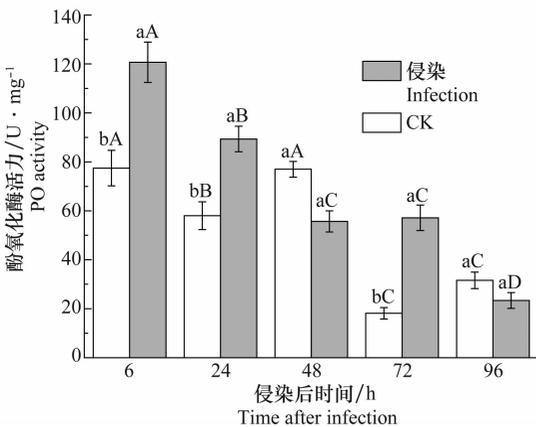


图2 绿僵菌侵染后黏虫血淋巴酚氧化酶活性的变化

Fig. 2 Changes in PO activity in the hemolymph in 6th instar larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae*

## 2.3 绿僵菌侵染对黏虫体内溶菌酶活性的影响

对照组黏虫的溶菌酶活性随日龄的增加先升高

后降低,在 48 h 达到最高峰,72 h 则出现显著下降( $P<0.05$ );而被绿僵菌侵染后,其幼虫血淋巴溶菌酶活性在侵染初期 6 h 显著高于对照( $P<0.05$ ),之后随着时间的延长溶菌酶活性开始降低,且在 48 h 显著低于对照组( $P<0.05$ )。在化蛹前期(96 h)时,其溶菌酶活性又再次上升。

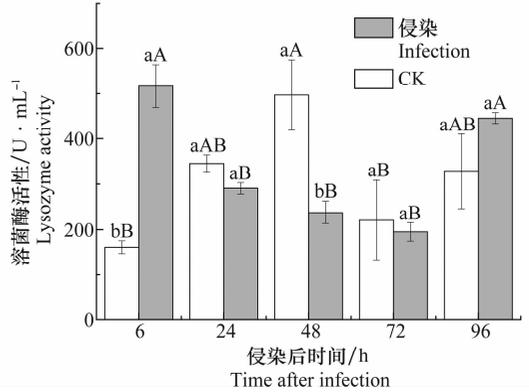


图3 绿僵菌侵染后黏虫血淋巴溶菌酶活性的变化

Fig. 3 Changes in lysozyme activity in the hemolymph in 6th instar larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae*

## 2.4 绿僵菌侵染对黏虫体内抗菌活力的影响

测试期间对照组黏虫不同时间血淋巴抗菌活性差异并不明显( $P>0.05$ );绿僵菌侵染后其抗菌活性的变化与对照组相似,但在 24 h 显著升高( $P<0.05$ );侵染后 6、24、48 h,侵染组幼虫抗菌活性均与对照组无显著差异( $P>0.05$ ),侵染后 72、96 h,其抗菌活性受到抑制,72 h 时明显低于对照( $P<0.05$ )。

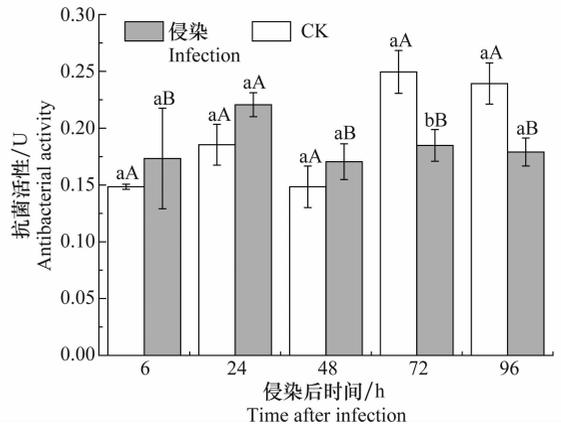


图4 绿僵菌侵染后黏虫血淋巴抗菌活性的变化

Fig. 4 Changes in antibacterial activity in the hemolymph in 6th instar larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae*

## 2.5 绿僵菌侵染对黏虫血细胞数量和比率的影响

对血细胞数目的研究表明,对照组和侵染组黏虫血细胞总数随日龄的增加均逐步升高,但侵

染组的血细胞总数在 72 h 时达到最高值,不同时间的血细胞总数除 96 h 外均高于对照组,其中侵染后 6 h 和 24 h 与对照组的差异达到了显著水平( $P < 0.05$ )。同时,侵染后 6、24、72 h 黏虫浆血细胞比率较对照组显著增加( $P < 0.05$ ),而粒细胞与对照组相比,差异并不显著( $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 绿僵菌侵染后血细胞总数、浆血细胞和粒细胞百分数的变化<sup>1)</sup>

Table 1 Changes in the amount of total hemocytes, the percentage of plasmacyte and granulocyte in 6th instar larvae of *Mythimna separata* infected by *Metarhizium anisopliae*

感染后时间/h Time after infection	血细胞总数/ $\times 10^6$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ Total hemocyte count		浆血细胞/% Plasmacytes		粒细胞/% Granular hemocytes	
	对照 CK	侵染 Infection	对照 CK	侵染 Infection	对照 CK	侵染 Infection
6	1.56 $\pm$ 0.11	2.21 $\pm$ 0.15*	43.39 $\pm$ 1.26	49.62 $\pm$ 2.65*	19.18 $\pm$ 1.24	23.18 $\pm$ 2.64
24	1.86 $\pm$ 0.23	2.66 $\pm$ 0.18*	39.36 $\pm$ 2.21	45.36 $\pm$ 1.71*	21.75 $\pm$ 2.16	22.68 $\pm$ 1.24
48	2.01 $\pm$ 0.15	2.54 $\pm$ 0.21	43.68 $\pm$ 3.32	43.25 $\pm$ 2.98	20.36 $\pm$ 3.98	19.26 $\pm$ 2.68
72	2.53 $\pm$ 0.18	3.02 $\pm$ 0.23	42.21 $\pm$ 2.56	46.36 $\pm$ 0.86*	23.18 $\pm$ 0.95	26.24 $\pm$ 0.87
96	2.86 $\pm$ 0.35	2.84 $\pm$ 0.24	48.63 $\pm$ 3.54	51.36 $\pm$ 3.65	26.14 $\pm$ 1.35	25.36 $\pm$ 1.68

1) 表中列出的数据为平均数 $\pm$ 标准误。\* 表示对照组和侵染组间差异显著( $P < 0.05$ )。

Data are presented as mean $\pm$ SE. \* indicates significant difference between the control and treatment ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

昆虫体内含有多种蛋白质,这些蛋白质不仅在昆虫组织形成、物质代谢的过程中起着重要作用,同时与虫体生长发育的激素调控及免疫应答机制等方面也有着密切的联系<sup>[23]</sup>。昆虫蛋白通过调节机体特异性和非特异性免疫功能,发挥其增强免疫的作用,从而提高虫体对外界刺激的抵御能力<sup>[24]</sup>。本研究结果表明,黑化黏虫被侵染后,血淋巴蛋白含量出现显著的变化,表明绿僵菌的入侵刺激黑化黏虫产生防御反应,诱导脂肪体中蛋白质的合成与分泌发生变化;同时在侵染初期蛋白含量显著增加,推测此时黏虫幼虫初始接受到外源刺激,产生相关的免疫反应来抵抗绿僵菌的侵染,表现为蛋白质含量明显增加;之后随着免疫反应的趋缓与免疫能量的消耗,虫体内蛋白质含量开始减少。

PO 是昆虫体液免疫中及其重要的免疫防卫因子,酚氧化酶可以催化酪氨酸产生多巴,多巴氧化为醌并最终产生黑色素。当外源生物入侵时通过特异性级联反应而活化,产生黑化反应来提高昆虫的抵抗能力。试验中 PO 的活性随着日龄的增加而下降,与小菜蛾幼虫受小菜蛾颗粒体病毒 PlxyGV 感染后 PO 活性的变化规律相同<sup>[25]</sup>;绿僵菌侵染后,幼虫 PO 活性也发生显著变化,表明幼虫免疫水平的改变。绿僵菌侵染初期 PO 活性增强显著,且在这个时期,幼虫蜕皮后表皮开始逐渐变黑,较高的 PO 活性有助于虫体防御能力的提高,同时 PO 介导的黑化作用来帮助幼虫抵抗绿僵菌的侵染,并且在病原物刺激的初始阶段,是虫体内部免疫反应最活跃

时期。

溶菌酶来源于昆虫的脂肪体,释放到血淋巴中。昆虫处于不正常生理状态下时,血淋巴中的溶菌酶的活性会产生极大变化。感染、出血、受伤以及各种环境压力下,都能使溶菌酶的数量急剧增加<sup>[26]</sup>。之后随着免疫反应的进行,其免疫能力的消耗会导致溶菌酶活性的减少,本试验中所得结果与许红兵等相似<sup>[27]</sup>,但在侵染后 96 h,与对照组相比,其溶菌酶活性再次升高,这可能由于幼虫即将化蛹的原因,黏虫对外界刺激更加敏感,诱导宿主的免疫反应来协助化蛹的进行。绿僵菌侵染后,黏虫血淋巴中抗菌活性物质开始生成,其抗菌活力先增加后趋缓,与 PO 活性、溶菌酶等免疫指标的变化趋势有所不同,这些结果表明昆虫免疫功能之间很可能存在着相互平衡,在受到外界胁迫时,可以将有限的能量进行合理分配,从而最大化地有利于虫体正常生长发育。

本试验中绿僵菌侵染后黏虫幼虫血细胞总数目和免疫血细胞数目与比率均有不同程度的提升,与邓日强等用核多角体病毒 SpltMNPV 感染斜纹夜蛾幼虫后血细胞总数目、比率变化相同<sup>[28]</sup>,初步表明了虫体内细胞免疫过程的发生,而相关免疫过程如吞噬作用、形成结节、包被等免疫行为还需要进一步的研究。粒细胞和浆血细胞是参与细胞免疫应答最相关的两种细胞<sup>[29]</sup>,侵染后黏虫幼虫粒细胞和浆血细胞数量和比率的增加是幼虫群体抵抗外源刺激物的适应性特征,与幼虫免疫能力的提升密切相关。

综上所述,对黏虫各免疫指标的分析表明,绿僵菌侵染对黏虫 6 龄幼虫的蛋白含量、免疫酶活性、血

细胞数量等生理指标有显著影响。黏虫幼虫在受到侵染后,虫体会通过体液免疫和细胞免疫的共同作用而产生防御反应。本文对黏虫防御行为-免疫应答间的关系提供了一定的理论依据,对揭示黏虫抵抗病原体侵染的能力、机理及黏虫成灾机制具有重要意义。

## 参考文献

- [1] LAMBERTY M, ADES S, UTTENWEILER-JOSEPH S, et al. Insect immunity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9320 - 9326.
- [2] LAVINE M D, STRAND M R. Insect hemocytes and their role in immunity [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 32(10): 1295.
- [3] SCHMIDT O, THEOPOLD U, STRAND M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids [J]. *Bioessays*, 2001, 23(4): 344 - 351.
- [4] 卢亚萍,潘宏涛. Aegis 溶菌酶的抑菌作用及抑菌机理初步研究[J]. *饲料与畜牧*, 2007(12): 15 - 17.
- [5] LEONARD C, RATCLIFFE N A, ROWLEY A F. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1985, 31(10): 789 - 799.
- [6] 李志强,陈国生,王茂先,等. 昆虫体液免疫的分子生物学[J]. *生命的化学*, 2003, 23(5): 348 - 351.
- [7] ADAMO S A, WEBSTER J P. Neural parasitology: how parasites manipulate host behaviour [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(1): 1 - 2.
- [8] REYNOLDS J J H, WHITE A, SHERRATT J A, et al. The population dynamical consequences of density-dependent prophylaxis [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 288(1): 1 - 8.
- [9] 李光博,王恒祥,胡文绣. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验[J]. *植物保护学报*, 1964, 3(2): 101 - 110.
- [10] 江幸福,张蕾,程云霞,等. 我国粘虫研究现状及发展趋势[J]. *应用昆虫学报*, 2014(4): 881 - 889.
- [11] 张云慧,张智,姜玉英,等. 2012年三代黏虫大发生原因初步分析[J]. *植物保护*, 2012, 38(5): 1 - 8.
- [12] 江幸福,张蕾,程云霞,等. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(6): 1444 - 1449.
- [13] 姜玉英,李春广,曾娟,等. 我国粘虫发生概况:60年回顾[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(4): 890 - 898.
- [14] 罗礼智,徐海忠,李光博. 粘虫幼虫密度对幼虫食物利用率的影响[J]. *昆虫学报*, 1995, 38(4): 428 - 435.
- [15] 罗礼智,李光博,曹雅忠,等. 粘虫幼虫密度对成虫飞行与生殖的影响[J]. *昆虫学报*, 1995, 38(1): 38 - 45.
- [16] 白毓昕. 幼虫密度对粘虫生长发育及防御能力的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [17] 吕伟祥,江幸福,张蕾,等. 一日龄粘虫不同时长吊飞对生殖及寿命的影响[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(4): 914 - 921.
- [18] 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, 27(2): 12 - 15.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 3177 - 3188.
- [20] WILSON K, THOMAS M B, BLANFORD S, et al. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2002, 99(8): 5471 - 5475.
- [21] 赵娇,戚晓玉,尤瑜敏,等. 日本对虾的酚氧化酶特性研究[J]. *上海海洋大学学报*, 1997(3): 157 - 165.
- [22] 董文娟,王学英,张涛,等. 柞蚕滞育蛹抗菌物质产生及其抑菌活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(4): 990 - 991.
- [23] 张国洲,王亚维,徐汉虹.  $\beta$ -谷甾醇等化合物对昆虫血淋巴蛋白含量的影响[J]. *湖北农学院学报*, 2000, 20(3): 201 - 202.
- [24] 刘守柱,杜学林,戴明勋. 昆虫酚氧化酶特性及其生理学功能[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(34): 19249 - 19251.
- [25] 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.
- [26] GLINSKI Z, JAROSZ J. Mechanical and biochemical defences of honey bees [J]. *Bee World*, 1995, 76(3): 110 - 118.
- [27] 许兵红,陈正耀. 昆虫体液免疫中的抗菌物质[J]. *昆虫知识*, 1999, 36(5): 316 - 319.
- [28] 邓日强,利翠英. 斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后血细胞的病理变化[J]. *中山大学学报论丛*, 1995(2): 18 - 20.
- [29] 贺媛. 亚剂量氟铃脲对昆虫免疫的干扰机制及血细胞高通量药物筛选[D]. 上海:华东理工大学,2011.

(责任编辑:田喆)

(上接 96 页)

- [43] 贾变桃,洪珊珊,张雨超,等. 阿维菌素对半闭弯尾姬蜂保护酶系和解毒酶系的影响[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(5): 990 - 995.
- [44] 廖月枝,严善春,李小平,等. 甲氧虫酰胺对舞毒蛾幼虫保护酶活性的影响[J]. *林业科学*, 2011, 47(9): 93 - 99.
- [45] 张文成,王开运,牛芳,等. 虫螨腈胁迫对甜菜夜蛾保护酶系和解毒酶系的诱导效应[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(5): 455 - 460.
- [46] 杨琼,王淑会,张文慧,等. 常用杀虫剂对异色瓢虫的毒力及其保护酶的影响[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(2): 258 - 263.
- [47] 齐浩亮,崔丽,王芹芹,等. 溴虫氟苯双酰胺对小菜蛾的毒力及
- 相关酶活性的影响[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 112 - 116.
- [48] 余慧灵,向兴,袁贵鑫,等. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响[J]. *昆虫学报*, 2015, 58(6): 634 - 641.
- [49] RUMPF S, HETZEL F, FRAMPTON C. Lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae and Chrysopidae) and integrated pest management: enzyme activity as biomarker of sublethal insecticide exposure [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1997, 90(1): 102 - 108.

(责任编辑:田喆)