

蜕皮激素对黑化黏虫体液免疫的影响

张乃元^{1,2}, 张 蕾², 程云霞², 张宝琴^{1*}, 江幸福^{2*}

(1. 海南大学植物保护学院, 海口 570228; 2. 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 为揭示蜕皮激素(MH)对黑化黏虫免疫能力的影响,本试验对被球孢白僵菌侵染后的黏虫体内 MH 含量的动态变化进行了分析比较,并对被侵染的黑化黏虫注射 20-羟基蜕皮酮(20E),分析比较其注射 20E 后的死亡率以及酚氧化酶(PO)和溶菌酶活性的变化。结果表明:被白僵菌侵染后,黑化黏虫 6 龄幼虫的 MH 含量在侵染后 8 h ($P<0.05$)、72 h ($P<0.05$)和 96 h ($P<0.05$)均显著高于对照(注射吐温-80)。注射球孢白僵菌后立即注射 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 稀释液,黑化黏虫的死亡率显著低于对照组(注射球孢白僵菌后注射无水乙醇) ($P<0.05$),其原因是注射 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 20E 稀释液后,被球孢白僵菌侵染后 8 h 和 24 h 的黑化黏虫体内 PO 和溶菌酶活性均显著高于对照组(注射球孢白僵菌后注射无水乙醇) ($P<0.05$)。试验结果表明 MH 在黏虫体液免疫反应中起到重要的调节作用。

关键词 黏虫; 黑化幼虫; 蜕皮激素; 20-羟基蜕皮酮; 酚氧化酶活性; 溶菌酶活性

中图分类号: S 433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020225

Effects of molting hormone on humoral immunity of the black *Mythimna separata* (Walker) larvae infected by *Beauveria bassiana*

ZHANG Naiyuan^{1,2}, ZHANG Lei², CHENG Yunxia², ZHANG Baoqin^{1*}, JIANG Xingfu^{2*}

(1. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. 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 investigate the effect of molting hormone (MH) on the immune ability of the black *Mythimna separata* (Walker) larvae, the dynamic changes of MH contents in *M. separata* larvae infected by *Beauveria bassiana* were analyzed and compared. 20-hydroxyecdysone (20E) was injected into the infected black larvae of *M. separata*, and the dynamic changes of phenol oxidase (PO) and lysozyme activities after 20E injection were analyzed and compared. The results showed that, after being infected with *B. bassiana*, the MH content of the 6th instar black larvae was significantly higher than in the control at 8 h ($P<0.05$), 72 h ($P<0.05$) and 96 h ($P<0.05$) after infection. *M. separata* infected with *B. bassiana* was injected with 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of 20E dilution, and the mortality rate was significantly lower than in the control (injecting anhydrous ethanol after being infected by *B. bassiana*) ($P<0.05$). After injection with 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of 20E dilution, the activity of PO and lysozyme in the black larvae of *M. separata* was significantly higher than that in the control (injecting anhydrous ethanol after being infected by *B. bassiana*) at 8 h, 24 h after being infected by *B. bassiana* ($P<0.05$). The experimental results suggest that MH plays an important role in regulating the humoral immune response of the black *M. separata* larvae.

Key words *Mythimna separata*; black larvae; molting hormone; 20E; PO activity; lysozyme activity

外界微生物时刻威胁着昆虫的存活,因此免疫系统在昆虫的生长发育过程中至关重要。先天免疫

系统是昆虫的主要免疫系统^[1],主要由细胞免疫和体液免疫组成。体液免疫中酚氧化酶(phenol oxi-

收稿日期: 2020-04-30

修订日期: 2020-05-19

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201403031);国家绿肥产业技术体系(CARS-22);国家自然科学基金(31672019, 31871951);国家重点研发计划(2017YFD0201701,2017YFD0201802);北京市自然科学基金((6172030)

* 通信作者 E-mail:张宝琴 991009@hainu.edu.cn;江幸福 xjiang@ippcaas.cn

dase, PO) 和溶菌酶 (lysozyme) 是免疫关键酶, PO 和溶菌酶活性是免疫反应的重要指标^[2]。昆虫免疫系统受内分泌系统调节, 内分泌激素在昆虫的免疫反应中起重要的调节作用^[3-4]。昆虫体内主要的内分泌激素是保幼激素 (juvenile hormone, JH) 和蜕皮激素 (molting hormone, MH), 它们在昆虫的生长过程中不仅可以联合调控昆虫的变态、迁飞和繁殖, 而且在昆虫的免疫系统中也有非常重要的调控功能^[5]。JH 是昆虫咽侧体分泌的一种生长调节剂, 能够保持幼虫状态、抑制蜕皮和变态, 调控昆虫生命周期中每一个重要发育阶段的转变, 在昆虫发育的临界期高浓度 JH 会阻碍变态提前发生^[5-6]。蜕皮激素的主要成分是 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E), 主要作用是激发昆虫的蜕皮活动, 调节昆虫所有的幼虫态、蛹以及成虫的转换。在针对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究中发现, 注射 20E 后, 黑腹果蝇的细胞吞噬功能和 PO 活性得到了增强^[7]。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 在注射 20E 后, 细胞吞噬功能提高, 细胞免疫明显增强^[8]。JH 和 MH 对昆虫细胞免疫既有正调控作用, 也有负调控作用, 并可通过增强或抑制 PO 活性来调节昆虫体液免疫。

黏虫是严重威胁我国主要粮食作物生产安全的重大农业害虫^[9-10]。由于近年来黏虫在我国局部地区常常暴发, 对粮食生产安全带来重大威胁^[11]。暴发的黏虫幼虫发生黑化现象已成常态, 其免疫能力显著增强^[12-13]。但这种免疫能力是否受到内分泌激素的影响还不清楚, 关于黑化黏虫内分泌激素 MH 如何调控免疫反应未见报道。因此, 本研究旨在明确黑化黏虫 6 龄幼虫被球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染后其内分泌激素 MH 的含量变化。注射 20E 稀释液后, 明确被白僵菌侵染的黑化黏虫幼虫死亡率的变化以及体液免疫中 PO 和溶菌酶活性的变化, 揭示黑化黏虫体液免疫和内分泌调节机制间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试菌株: 球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株由中国农业科学院植物保护研究所蔬菜害虫组提供。使用 0.01% 吐温-80 溶液配制 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 cfu/mL 和 10^8 cfu/mL 的球孢白僵

菌孢子悬浮液进行预试验, 经 SPSS-Probit 回归模型分析处理, 球孢白僵菌对黑化黏虫的 LC_{50} 约为 10^6 cfu/mL, 本试验所有黏虫感染球孢白僵菌的浓度均为 10^6 cfu/mL。

供试昆虫及饲养: 供试黏虫采集于吉林省四平市公主岭市田间。在饲养瓶 (直径 9 cm × 高 13 cm) 中高密度诱导饲养, 饲养密度为 10 头/瓶^[12]。饲养方法参照郭栋、吕伟祥等室内人工饲养方式^[14-15], 每日更换 30~50 cm 高的玉米苗直至幼虫停止取食。饲养温度设置为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度设置为 $(70 \pm 5)\%$, 光周期设置为 L//D=14 h//10 h。

1.2 球孢白僵菌和外源蜕皮激素注射方法

1.2.1 黑化黏虫幼虫白僵菌注射方法

根据预试验的结果, 球孢白僵菌浓度 10^6 cfu/mL 注射后可以激活黑化黏虫 6 龄幼虫的免疫反应, 且有近半数黏虫幼虫可以完成世代发育。将蜕皮 24 h 内的黑化黏虫 6 龄幼虫置于冰上冷冻麻醉 15 min, 幼虫静止后, 使用微量注射器吸取 10^6 cfu/mL 的球孢白僵菌孢子悬浮液 $1 \mu\text{L}$, 注入幼虫第 3 与第 4 腹足之间的腹部。处理对照组注射 0.01% 吐温-80 溶液。每个处理组 30 头虫, 每个处理重复 3 次。幼虫伤口闭合并且晾干后, 放入装有新鲜玉米幼苗的饲养瓶中继续饲养。

1.2.2 黑化黏虫幼虫 20E 稀释液注射方法

取 20 mg 20E 加入 1 mL 无水乙醇充分溶解混匀后, 得到 $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 母液。用无水乙醇对 $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 母液 2 倍梯度稀释, 得到浓度为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 稀释液并进行编号。蜕皮 24 h 内的黑化黏虫 6 龄幼虫注射球孢白僵菌孢子悬浮液后, 立刻对其注射 20E 液。对照组为注射球孢白僵菌孢子悬浮液后立刻注射无水乙醇。每个处理组 30 头虫, 每个处理重复 3 次。注射方法同 1.2.1。

1.3 免疫指标测定方法

1.3.1 MH 含量测定方法

在注射球孢白僵菌后 8、24、48、72 h 和 96 h 分别取对照组 (注射吐温-80) 以及处理组 (被白僵菌侵染) 的黏虫血淋巴样品, 每次采集 3 头黏虫, 每头幼虫采集血淋巴约 $50 \mu\text{L}$, 每头黏虫血淋巴样品重复测试 3 次。使用昆虫蜕皮激素 (MH) 试剂盒测定 MH 含量。在 96 孔酶标板中设空白孔、标准孔和样品孔。标准孔中加入稀释为 10、20、40、80、160 ng/L

的 MH 标准品,样品孔中加入待测样品及样品稀释液后在预热至 37℃ 的水浴锅中温育 30 min。温育后弃去板中的液体,使用洗涤液洗板并拍干。加入酶标试剂温育 30 min 并使用洗涤液洗涤拍干。加入显色试剂在 37℃ 的水浴锅避光显色 15 min。避光显色后加入终止剂终止反应,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD),分别通过标准曲线计算样品中的 MH 含量。

1.3.2 被球孢白僵菌侵染的黑化黏虫注射 20E 后幼虫死亡率测定

每天观察记录对照组(被白僵菌侵染后仅注射无水乙醇)的黑化黏虫 6 龄幼虫,以及处理组(被白僵菌侵染后)分别注射 1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 20E 稀释液的黑化黏虫 6 龄幼虫的存活情况,统计幼虫死亡数量,直至幼虫化蛹。统计分析黑化黏虫幼虫的校正死亡率。每个处理组 30 头虫,每个处理重复 3 次。选取对黑化黏虫死亡率影响最显著的 20E 稀释液进行血淋巴免疫酶活性测定试验。

1.3.3 血淋巴 PO 和溶菌酶活性的测定

处理组在注射球孢白僵菌孢子悬浮液后注射 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 20E 稀释液。处理对照组在注射球孢白僵菌后注射无水乙醇。另设空白组不作处理以验证注射球孢白僵菌的黑化黏虫 6 龄幼虫被侵染成功。在被白僵菌侵染后 8、24、48、72 h 和 96 h 取黏虫血淋巴样品,每次采集 3 头黏虫,每头采集约 50 μL ,每头黏虫血淋巴重复测试 3 次。使用酶联免疫试剂盒测定溶菌酶和 PO 活性。试剂盒操作方法参照 1.3.1。

1.4 数据统计与分析

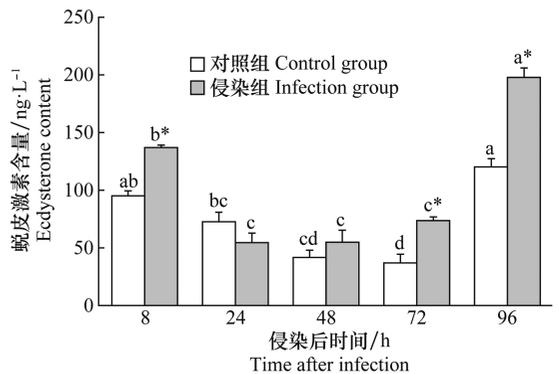
数据采用 Excel 进行统计,所有数据采用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示,应用统计软件 SPSS 24.0 对数据进行分方差分析。用单因素方差分析(ANOVA)Tukey's HSD 和独立样本 *t* 测验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 白僵菌侵染对黑化黏虫幼虫体内 MH 含量的影响

从图 1 可以看出,黑化黏虫幼虫的 MH 含量随侵染后时间的增加呈先降低再升高的趋势,总体上呈现侵染组高于对照组(侵染后 24 h 除外)。对照

组(注射吐温-80)MH 含量在处理 8~72 h 呈下降趋势。在处理 96 h 时 MH 含量显著升高($F_{4,40} = 25.131, P < 0.05$),达到 120.00 ng/L。与对照组相比,注射球孢白僵菌后,在侵染初期 8 h 时黑化黏虫幼虫的 MH 含量达到 136.96 ng/L,显著高于对照组的 95.25 ng/L($t = -9.028, df = 16, P < 0.05$),是对照组的 1.44 倍。在侵染中期 24 h 时, MH 含量低于对照组,仅为 54.54 ng/L。48 h 时 MH 含量高于对照但无显著差异($t = -1.112, df = 16, P > 0.05$)。而在侵染后期 72 h($t = -4.510, df = 16, P < 0.05$)、96 h($t = -6.889, df = 16, P < 0.05$)时,黑化黏虫幼虫的 MH 含量显著增加,并且显著高于对照组。在侵染后 96 h 时达到最大值 197.79 ng/L,是对照组的 1.65 倍。



图中数据为平均值 \pm 标准误;不同小写字母表示同一处理不同时间差异显著(HSD测验, $P < 0.05$)。*表示侵染组与对照组在相同侵染时间差异显著(*t*测验, $P < 0.05$)

Data in the chart are mean \pm SE. Different lowercase letters indicate significant difference in the same treatment at different time points (HSD test, $P < 0.05$). * indicates that the infected group and the control group are significantly different at the same time (*t* test, $P < 0.05$)

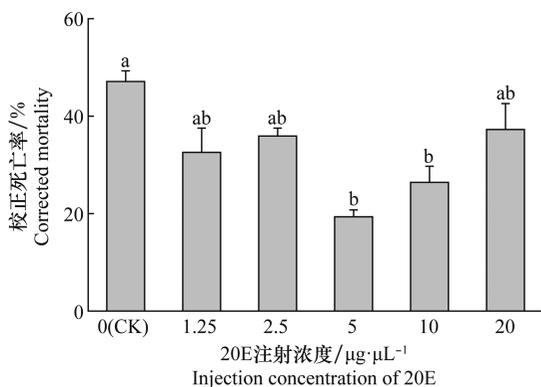
图 1 白僵菌侵染后黏虫幼虫蜕皮激素含量的变化

Fig. 1 Changes in the juvenile hormone content of *Mythemna separata* larvae infected by *Beauveria bassiana*

2.2 注射 20E 对被菌侵染的黑化黏虫死亡率的 影响

由图 2 可以看出,注射球孢白僵菌的黑化黏虫幼虫在注射不同浓度 20E 后,其校正死亡率有不同程度的下降。注射 1.25、2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 后黑化黏虫的校正死亡率有所降低,但与注射无水乙醇的对照组相比,差异不显著($F_{5,12} = 2.909, P > 0.05$)。注射 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 后黑化黏虫的校正死亡率显著降低($F_{5,12} = 2.909, P < 0.05$),分别为 19.28% 和 26.51%。供试的 5 个浓度中,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20E 处理后被侵染的黑化黏虫的死亡率显著低于对照组($F_{5,12} = 2.909, P < 0.05$)。

这说明注射 20E 有利于黏虫免疫能力增强。



图中数据为平均值±标准误;不同小写字母表示不同处理差异显著($P<0.05$)
Data in the chart are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$)

图 2 白僵菌侵染后注射 20E 黏虫幼虫校正死亡率的变化

Fig. 2 Changes of the corrected mortality of *Mythimna separata* larvae injected with 20E after infected by *Beauveria bassiana*

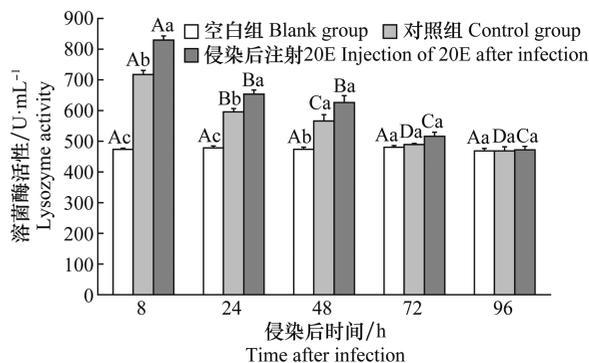
2.3 注射 20E 对被菌侵染的黑化黏虫幼虫溶菌酶活性的影响

从图 3 中可以看出,空白对照组(不作处理)溶菌酶活性较低,在不同时间其活性无显著差异($F_{4,40} = 0.366, P>0.05$)。对照组(被球孢白僵菌侵染后仅注射无水乙醇)被球孢白僵菌侵染后,体液免疫激活,溶菌酶活性增加。被球孢白僵菌侵染后注射 20E 的处理组免疫反应增强,溶菌酶活性高于对照组。注射 20E 的处理组的溶菌酶活性与对照组变化趋势相同,在侵染后随时间增加溶菌酶活性降低。对照组溶菌酶活性在被侵染后 8 h 最高,达到最大值 717.61 U/mL,随后溶菌酶活性开始下降,随侵染后时间的增加,溶菌酶活性逐渐趋于稳定。经 20E 诱导的黑化黏虫幼虫的溶菌酶活性在 8 h 时最高,并显著高于其他时间($F_{4,40} = 97.262, P<0.05$)。被白僵菌侵染后 8 h($F_{2,24} = 386.35, P<0.05$)和 24 h($F_{2,24} = 128.323, P<0.05$)时 20E 处理组溶菌酶活性显著高于对照组,在侵染 48 h 之后,注射 20E 的处理组的溶菌酶活性也逐渐回到空白组基线水平。

2.4 注射 20E 对被菌侵染的黑化黏虫幼虫 PO 活性的影响

从图 4 中可以看出,空白组 PO 活性较低,在不同时间无显著差异($F_{4,40} = 2.885, P>0.05$)。处理对照组在注射球孢白僵菌后,球孢白僵菌激活了黑化黏虫的体液免疫,其 PO 活性增加。24 h 时 PO

活性达到最大值 132.25 U/mL。随被侵染时间的增加,其 PO 活性显著降低($F_{4,40} = 225.340, P<0.05$)。注射球孢白僵菌后又注射 20E 的处理组,黑化黏虫经 20E 诱导后免疫反应增强,PO 活性高于对照组。在侵染后 8 h($F_{2,24} = 250.345, P<0.05$)、24 h ($F_{2,24} = 235.849, P<0.05$)和 48 h($F_{2,24} = 121.385, P<0.05$)20E 处理组 PO 活性均显著高于对照组,并在侵染后 8 h 达到最大值 156.83 U/mL。



图中数据为平均值±标准误;不同大写字母表示相同处理不同侵染时间差异显著($P<0.05$)。不同小写字母表示相同侵染时间不同处理差异显著($P<0.05$)。下同

Data in the chart are mean±SE. Different capital letters indicate that the same treatment differs significantly at different time points ($P<0.05$). Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time ($P<0.05$). The same applies below

图 3 白僵菌侵染后注射 20E 黏虫幼虫溶菌酶活性的变化

Fig. 3 Changes of the lysozyme activity of *Mythimna separata* larvae injected with 20E after infected by *Beauveria bassiana*

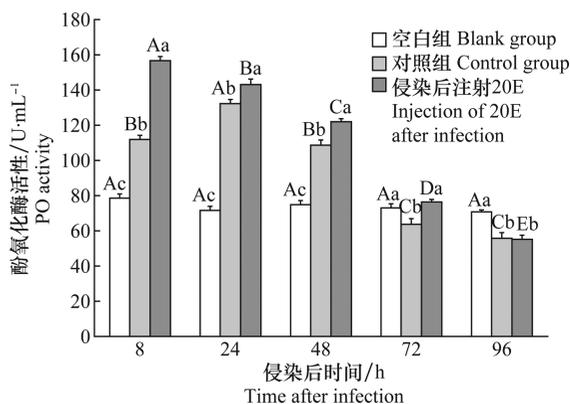


图 4 白僵菌侵染后注射 20E 黏虫幼虫酚氧化酶活性的变化

Fig. 4 Changes of the PO activity of *Mythimna separata* larvae injected with 20E after infected by *Beauveria bassiana*

3 讨论

昆虫种类繁多、形态各异,在长期的进化过程中,作为地球上数量最多、分布最广的动物群体,逐

渐形成了独特的免疫机制。神经和内分泌系统对昆虫的免疫功能起到主要的调节作用^[3-4]。昆虫体内的蜕皮激素(MH)已被证明在发育、变态、生殖等方面具有重要作用,并且对昆虫的先天免疫反应有重要调控作用^[10,16-18]。蜕皮激素的主要成分 20-羟基蜕皮酮(20E)可以激活细胞免疫和体液免疫来对抗外源入侵微生物,而外源微生物的刺激也会通过 3-脱氢蜕皮激素-3 β -还原酶促进 20E 滴度升高^[19]。本试验通过对黑化黏虫 6 龄幼虫注射球孢白僵菌来测定黑化黏虫幼虫体内的 MH 含量,发现被侵染后的黑化黏虫体内的 MH 含量出现显著变化。MH 含量在侵染后高于对照组,侵染后 8、72 h 和 96 h 尤为明显。其原因是被球孢白僵菌侵染后,20E 可以迅速激活免疫反应来对抗外源入侵微生物。这说明 MH 在黑化黏虫体液免疫反应中起到重要的调节作用。

近年来的研究发现,昆虫体液免疫可以受 20E 调控,酚氧化酶(PO)和溶菌酶等保护昆虫免受伤害^[18,20-21]。酚氧化酶是昆虫体液免疫中非常重要的免疫因子。在昆虫表皮的硬化和黑化的过程中酚氧化酶具有重要作用。在昆虫受到外源病原物的刺激时酚氧化酶同样具有重要作用。酚氧化酶活性是衡量昆虫体液免疫的重要指标之一^[22]。黑腹果蝇注射 MH 后,其体内的 PO 活性增强^[7]。针对埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的研究发现,鉴定到的一条 PO 基因序列中有 2 个可以结合 20E 受体复合物 EcR/USP 的顺式作用元件,20E 的刺激能上调 PO 的转录表达^[23]。本试验结果与上述试验结果一致。通过对球孢白僵菌侵染后的黑化黏虫 6 龄幼虫注射 20E 稀释液来测定黑化黏虫血淋巴中的酚氧化酶活性。黑化黏虫 6 龄幼虫被球孢白僵菌侵染后,经 20E 稀释液诱导其 PO 活性显著增强,幼虫的免疫水平因外源 20E 诱导而提高。未经 20E 稀释液诱导的对照组黑化黏虫幼虫的酚氧化酶活性显著低于经 20E 稀释液诱导的试验组。这表明 20E 处理组的黑化黏虫幼虫的体液免疫功能明显增强。

在昆虫的非特异性免疫中,溶菌酶同样是非常重要的免疫因子。溶菌酶通过昆虫的脂肪体分泌释放到血淋巴中。昆虫在受到外界环境刺激时,溶菌酶的活性急剧增加^[24]。当外界的病原物进入昆虫体内后,病原体细胞壁会在溶菌酶的作用下破裂并使内容物溢出,最终病原细胞破裂死亡^[25]。针对棉铃虫的研究发现,棉铃虫 20E 滴度增高,脂肪体中溶

菌酶基因的转录表达上调^[26]。针对东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的研究发现,溶菌酶基因在转录水平上可被 20E 显著上调^[27]。本试验结果与上述试验结果一致。本试验通过对白僵菌侵染后的黑化黏虫 6 龄幼虫注射 20E 稀释液来测定黑化黏虫血淋巴中的溶菌酶活性。试验中被侵染的黑化黏虫幼虫在注射 20E 稀释液后,溶菌酶活性的变化与酚氧化酶活性的变化趋势大致相同。这同样表明 20E 对黑化黏虫幼虫的体液免疫功能有增强作用。

综上所述,对黑化黏虫内分泌激素含量的分析表明,黑化黏虫 6 龄幼虫被球孢白僵菌侵染后,MH 的分泌显著提高。对酚氧化酶和溶菌酶活性的分析表明,在注射 20E 稀释液后,黑化黏虫幼虫的酚氧化酶活性和溶菌酶活性显著提高。本试验证明,黑化黏虫 6 龄幼虫在受到外源病原微生物侵染后,虫体通过内分泌激素对免疫系统进行调控从而增强免疫反应。本文试验结果对黑化黏虫免疫机制和内分泌调节机制间的关系提供了一定的理论依据,对揭示黑化黏虫、防御能力和免疫应答三者间联系具有重要意义。

参考文献

- [1] AGGRAWAL K, SILVERMAN N S. Peptidoglycan recognition in *Drosophila* [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35(Pt 6):1496-1500.
- [2] 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.
- [3] ADAMO S A, WEBSTER J P. Neural parasitology: how parasites manipulate host behavior [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(1):1-2.
- [4] ADAMO S A. The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2014, 54(3): 419-426.
- [5] 黄志君, 李庆荣, 钟仰进, 等. 昆虫变态发育的激素调控[J]. *广东蚕业*, 2004(2): 42-45.
- [6] BOWNES M, REMBOLD H. The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the life cycle of *Drosophila melanogaster* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 164(3):709-712.
- [7] DIMARCQ J L, IMLER J L, LANOT R, et al. Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 1997, 27(10): 877-886.

- 小蜂过冷却点测定的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(1): 50-53.
- [10] 赵龙龙, 张未仲, 胡增丽, 等. 冬型中国梨木虱在梨树不同部位的产卵特点[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 201-204.
- [11] GE Yang, ZHANG Liu, QIN Zifang, et al. Different predation capacities and mechanisms of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on two morphotypes of pear psylla *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) [J/OL]. PLoS ONE, 2019, 14(4): e0215834. DOI:10.1371/journal.pone.0215834.
- [12] SALT W R. Principles of insect cold-hardiness [J]. Annual Review of Entomology, 1961, 6(1): 55-74.
- [13] ZHAO Longlong, JIA Dong, YUAN Xiaoshuai, et al. Cold hardiness of the biological control agent, *Agasicles hygrophila*, and implications for its potential distribution [J]. Biological Control, 2015, 87: 1-5.
- [14] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性研究[J]. 生态学报, 2002, 22(12): 2202-2207.
- [15] 岳雷, 郭建英, 周忠实, 等. 冷驯化对昆虫耐寒性及其适合度的影响[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(2): 286-293.
- [16] 王宪辉, 齐宪磊, 康乐. 昆虫的快速冷驯化现象及其生态适应意义[J]. 自然科学进展, 2003, 13(11): 1128-1133.
- [17] 万婕, 阎伟, 刘丽, 等. 变温与持续低温冷暴露对红棕象甲成虫耐寒性的影响[J]. 植物保护, 2015, 41(4): 146-150.
- [18] YOCUM G D, RINEHART J P, KEMP W P. Duration and frequency of a high temperature pulse affect survival of emergence-ready *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) during low-temperature incubation [J]. Journal of Economic Entomology, 2012, 105(1): 14-19.
- [19] CHEN Chengping, DENLINGER D L. Reduction of cold injury in flies using an intermittent pulse of high temperature [J]. Cryobiology, 1992, 29(1): 138-143.
- [20] 丁排红. 梨木虱的发生规律及防治技术[J]. 山西果树, 2019(6): 93-94.
- [21] 张武杰. 黑龙江省中国梨木虱发生规律及防治技术[J]. 中国林副特产, 2006(6): 46-47.
- (责任编辑: 杨明丽)
-
- (上接 106 页)
- [8] 柴连琴, 苗迎春, 王乐. 20-羟基蜕皮酮对棉铃虫免疫系统的影响[J]. 四川动物, 2015, 34(5): 739-747.
- [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(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, 51(4): 881-889.
- [11] 张蕾, 刘悦秋, 程云霞, 等. 黏虫黑化引起的免疫致新机制的思考[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 8-12.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 郭栋. 群居型与散居型粘虫免疫反应差异、神经调节及对飞行的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [15] 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.
- [16] MEISTER M, RICHARDS G. Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipterin gene in *Drosophila* larvae [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 26(2): 155-160.
- [17] LANOT R, ZACHARY D, HOLDER F, et al. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila* [J]. Developmental Biology, 2001, 230(2): 243-257.
- [18] ZHANG Z, PALLI S R. Identification of a cis-regulatory element required for 20-hydroxyecdysone enhancement of antimicrobial peptide gene expression in *Drosophila melanogaster* [J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(5): 595-605.
- [19] SUN Wei, SHEN Yihong, ZHOU Liangxiao, et al. Ecdysone titer determined by 3DE-3 β -reductase enhances the immune response in the silkworm [J]. The Journal of Immunology, 2016, 196(4): 1646-1654.
- [20] FLATT T, HEYLAND A, RUS F, et al. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Experimental Biology, 2008, 211(16): 2712-2724.
- [21] RUS F, FLATT T, TONG Mei, et al. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity [J]. The EMBO Journal, 2013, 32(11): 1626-1638.
- [22] 时超美. 昆虫酚氧化酶原活化及其在免疫中的作用[J]. 昆虫知识, 2000(5): 310-314.
- [23] AHMED A, MARTÍN D, MANETTI A G, et al. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(26): 14795-14800.
- [24] GLINSKI Z, JAROSZ J. Mechanical and biochemical defences of honey bees [J]. Taylor & Francis, 2015, 76(3): 110-118.
- [25] 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.
- [26] WANG J L, CHEN L, TANG L, et al. 20-hydroxyecdysone transcriptionally regulates humoral immunity in the fat body of *Helicoverpa armigera* [J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23(6): 842-856.
- [27] HAN Pengfei, HAN Jiao, FAN Jiqiao, et al. 20-hydroxyecdysone activates PGRP-SA mediated immune response in *Locusta migratoria* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2017, 72: 128-139.
- (责任编辑: 杨明丽)