

注射大肠杆菌后草地贪夜蛾高龄幼虫的免疫应激反应

白耀宇* 孙佳琦

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 为采用生物技术防控草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的扩散为害, 对草地贪夜蛾 5 龄和 6 龄幼虫注射浓度为 1×10^9 CFU/mL 的大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌液, 并以注射等量磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 和未做任何处理 (CK) 为对照, 24 h 后测定幼虫体重、集结数和酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 活性。结果显示, 注射大肠杆菌菌液 24 h 后, 草地贪夜蛾 5 龄和 6 龄幼虫体重均受到抑制, 其体重分别为 0.170 g 和 0.411 g, 均显著低于 CK 的 0.181 g 和 0.484 g; 注射大肠杆菌菌液 24 h 后, 草地贪夜蛾 5 龄和 6 龄幼虫集结数分别为 135.0、338.4 个索引集结数 (the indexed nodules, INs), 前者极显著低于后者, 且均显著高于 CK 和 PBS 处理, 分别为 0.4、10.2 个 INs 和 0.3、10.9 个 INs; 注射大肠杆菌菌液 24 h 后, 草地贪夜蛾 5 龄幼虫 PO 活性为 $0.156 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 显著高于 CK 和 PBS 处理, 分别为 $0.046 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $0.066 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 但草地贪夜蛾 6 龄幼虫的 PO 活性为 $0.050 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 显著低于 CK 和 PBS 处理, 分别为 $0.066 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $0.069 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 且草地贪夜蛾 5 龄幼虫的 PO 活性显著高于 6 龄幼虫的 PO 活性。表明细菌感染后草地贪夜蛾不同高龄幼虫的免疫应激反应存在差异, 而这种差异可能受幼虫生长发育及细胞免疫和体液免疫功能之间权衡现象的影响。

关键词: 草地贪夜蛾; 大肠杆菌; 体重; 集结反应; 酚氧化酶活性

Immunological and stress responses of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* larvae to injecting *Escherichia coli*

BAI Yaoyu* SUN Jiaqi

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In order to control the damage and spread of *Spodoptera frugiperda* by biotechnology, the immunological and stress responses of the elder-instar larvae of *S. frugiperda* were studied on the basis of the analysis of body mass, nodulation and phenoloxidase (PO) activity at 24 h after injecting *Escherichia coli* solution of 1×10^9 CFU/mL, while the same amount of phosphate buffer solution (PBS) as control for *E. coli* injection. Meanwhile, those without any treatments were used as injection control (CK). The results showed that the body weight gain of both the fifth and sixth instar larvae of *S. frugiperda* was markedly inhibited by the *E. coli* injection. The body weights of the fifth and sixth instar larvae with the *E. coli* treatments were 0.170 g and 0.411 g, respectively, which were significantly lower than those (0.181 g and 0.484 g) of CK. For nodulation, the nodule numbers of the fifth instar larvae was 135.0 INs (the indexed nodules, INs) in the *E. coli* treatment, which was significantly lower than that of the sixth instar larvae (338.4 INs), and the INs of both the fifth and sixth instar larvae in respective treatments of the *E. coli* was significantly higher than CK values of 0.4 INs and 0.3 INs and PBS values of 10.2 INs

基金项目: 国家留学基金委资助(201706995025)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yybai711@163.com

收稿日期: 2020-05-28

and 10.9 INs. The PO activity of the fifth instar larvae with $0.156 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in the *E. coli* treatment was significantly higher than that of CK ($0.046 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) and PBS ($0.066 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$); but it was $0.050 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in the sixth instar larvae that was significantly lower than that of CK ($0.066 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) and PBS ($0.069 \text{ ABS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). In addition, the PO activity of the fifth instar larvae in the *E. coli* treatment was significantly higher than that of the sixth instar larvae. It is concluded that there were obvious differences in the immunological and stress responses of different instar larvae of *S. frugiperda* after injection by the *E. coli*, and the differences may be affected by the trade-offs among larval growth, cellular immunity and humoral immunity.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *Escherichia coli*; body mass; nodulation; phenoloxidase activity

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 自 2019 年 1 月从东南亚扩散进入我国后,目前在华南、西南、中华和华东等 22 个省、市、自治区均有分布,并有进一步传入华北、西北和东北的趋势(郭井菲等, 2019; 王磊等, 2019; 吴秋琳等, 2019)。该虫主要为害玉米、水稻和甘蔗等作物,属全球预警的跨国迁飞性重大农业害虫(吴超等, 2019)。

自然界昆虫均面临病原微生物入侵的风险,一旦入侵,它们身体就相应会产生免疫应激反应,而这种免疫应激反应及其程度可通过昆虫生长发育参数、集结反应和酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性等生理参数变化体现。集结反应作为主要细胞免疫反应,是入侵病原物被昆虫血细胞捕获形成鞘状包裹并导致病原物窒息或被活性氧自由基等杀死的过程(Howard et al., 1998; Nappi & Ottaviani, 2000)。体液免疫中的 PO 通常以无活性酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)形式存在于血淋巴中,当病原物入侵后 PPO 能在相关丝氨酸蛋白酶作用下活化,从而调节吞噬作用和参与脂肪体中溶菌酶合成等免疫反应(Gillespie et al., 1997; Bali & Kaur, 2013)。如苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 侵染草地贪夜蛾幼虫后,其通过改变寄主生理参数来抑制其取食和繁殖行为,从而导致幼虫和蛹的质量减少(Polanczyk & Alves, 2005);舞毒蛾 *Lymantria dispar* 5 龄幼虫接种虫霉菌 *Entomophaga maimaiga* 后,其摄食量减少,且从接种后第 3 天开始,感染幼虫的体重增加小于健康幼虫的体重增加(Hajek, 1989)。感染细菌后昆虫血细胞数量体现了其免疫能力的强弱,尤其与集结形成能力密切相关(冯从径等, 2011)。如亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 5 龄幼虫感染大肠杆菌 *Escherichia coli* 后,其血淋巴细胞免疫和体液免疫均受到明显影响,参与集结形成的血细胞总数、颗粒细胞、浆细胞和小球细胞数量明显增加,同时 PO 活性也显著增加(梁子才和程振衡, 1991; 冯从径等,

2011);家蝇 *Musca domestica* 幼虫感染大肠杆菌 24 h 内,其血细胞总数显著增加,且 16 h 内其浆细胞和颗粒细胞的比例也有明显增加(晏容等, 2009)。相反, Park & Kim (2003) 研究结果发现,甜菜夜蛾 *S. exigua* 幼虫注射嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophilus* 后,其血腔中血细胞的吞噬作用、集结形成、PPO 活化为 PO 及抗菌肽的产生均受到抑制。另外,昆虫血淋巴中集结数的变化也与注射细菌浓度和注射后细菌作用时间密切相关。如草地贪夜蛾 6 龄幼虫注射黏质沙雷细菌 *Serratia marcescens* 后,其集结数随该菌浓度 ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$) 增加而增加,注射浓度为 $1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ 的黏质沙雷细菌 25 h 后,草地贪夜蛾 6 龄幼虫集结数达到最大值,且集结数在注射后 50 h 内较稳定(Zhang et al., 2018);烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫注射黏质沙雷菌后,其集结反应强度与该菌浓度呈幂函数关系,而大麦虫 *Zophobas atratus* 小型和中型幼虫注射该菌后,其集结反应随注射后时间的增加而增强,集结数在注射后 24 h 达到最大值(Howard et al., 1998)。目前,尽管关于昆虫感染细菌后的免疫应激反应研究较多,但涉及草地贪夜蛾不同龄期幼虫注射大肠杆菌后其体重、集结反应和 PO 活性研究较少。

草地贪夜蛾幼虫对化学农药和微生物杀虫剂的抗性问題一直备受关注(吴超等, 2019),而不同龄期草地贪夜蛾幼虫对杀虫剂抗性存在较大差异,通常低龄幼虫抗性较低,而高龄幼虫抗性较高(金涛等, 2019)。Sun & Bai (2020) 研究表明,草地贪夜蛾 5 龄幼虫集结反应随注射大肠杆菌浓度的增加而增强,在浓度 $1 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$ 下的集结数最高;且在该注射浓度下,随注射后时间增加,集结数也增加,但注射后 22 h 集结数不再增加,并稳定在一定范围。因此,为了解大肠杆菌侵染后草地贪夜蛾的免疫应激反应,本试验选择草地贪夜蛾 5 龄和 6 龄高龄幼虫进行大肠杆菌菌液注射试验,并以注射等量磷酸盐缓冲

液(phosphate buffer solution, PBS)和未做任何处理为对照,注射后24 h测量每个处理试虫的体重、集结数和PO活性,通过比较分析明确注射大肠杆菌对草地贪夜蛾幼虫体重、集结数和PO活性的影响,以期为利用生物防治技术防控该害虫提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和菌株:草地贪夜蛾1龄幼虫购于美国 Benzon Research 公司。在长26 cm、宽13 cm 塑料方格盘(32个方格)中放入适量人工饲料供幼虫取食至化蛹,每个方格接种1头1龄幼虫;为了防止外源细菌等感染且利于幼虫呼吸,整个塑料方格盘表面塑封有透气的塑料薄膜,低温运输;到实验室后,直接将塑料方格盘转入温度27℃、相对湿度70%、光周期16 L:8 D人工培养箱中继续饲养至5龄和6龄幼虫,备用。化学感受态大肠杆菌 One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

LB(Lysogeny broth)液体培养基:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g和氯化钠10 g, ddH₂O定容至1 L。

试剂及仪器:人工饲料,美国 Benzon Research 公司;Pierce™ BCA蛋白质检测试剂盒(自带96孔板井),美国 Thermo Fisher Scientific 公司。37002-GROWC-09型人工培养箱,美国 Percival 公司;Hamilton 701型微量注射器、26和30号针头,瑞士 Hamilton Bonaduz AG 公司;MWCO 5000 Da Vivaspin 低温离心浓缩仪,美国 Sigma-Aldrich 公司;Leica M165C 解剖显微镜,美国 Buffalo Grove 公司;En-Spire™ 2300微量滴定读板仪,美国 PerkinElmer 公司;Pipet-Lite PL 手动单道和多道移液器,美国 Rainin 公司;JS703C 电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌菌液的制备

利用移液枪将大肠杆菌菌液转移到LB液体培养基中,将其置于摇床于37℃过夜培养12 h后收集培养物;将收集的培养物于8 000 g下离心5 min,取上清液在85℃加热1 h灭活,然后用无菌PBS(pH为6.4, 7.7 mmol/L Na₂HPO₄、2.65 mmol/L NaH₂PO₄和150 mmol/L NaCl)将灭活后菌液细菌菌落数稀释为1×10⁹ CFU/mL,备用。

1.2.2 注射试验

参考 Sun & Bai(2020)方法进行草地贪夜蛾注射试验。选取大小一致的草地贪夜蛾5龄和6龄幼

虫各96头,称重后将其置于冰上冷冻麻醉5 min,用200℃干热灭菌的微量注射器和30号针头吸取1×10⁹ CFU/mL大肠杆菌菌液注射到幼虫腹足内,每头注射5 μL,分别以注射等量PBS和未做任何处理(CK)为对照,每个处理草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫各32头。注射后用70%酒精对伤口进行表面消毒,然后置于70%酒精表面消毒的塑料培养皿中,于温度27℃、相对湿度70%、光周期16 L:8 D人工培养箱中用人工饲料饲养。

1.2.3 草地贪夜蛾体重和集结反应

注射后24 h,每个处理选择草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫各20头进行称重,并在1 h内完成。称重后对其进行解剖,统计血腔中集结数,在36 h内完成。对草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫解剖时,先沿幼虫腹末至头部切开体腔,使其尽可能展开;然后用昆虫针固定并用PBS清洗展开的体腔表面,成熟的集结则附着在血腔内表面或脏器上,不易被PBS冲洗掉。为了便于在解剖显微镜下统计血腔中集结数,从腹部末端肛门处开始至头部方向移除消化道,并检查和记录消化道可能携带的集结。移除消化道后,再用PBS清洗血腔,进一步观察血腔中的集结分布,测量集结,记录集结数。

注射大肠杆菌后,草地贪夜蛾幼虫血腔中形成的成熟集结直径变化很大,从20 μm到500 μm或其更大。为了量化集结数,在 Zhang et al.(2018)方法基础上,将索引集结(the indexed nodules, INs)定义为集结数计量单位,即当集结直径≤30 μm时,为1个索引集结,当30 μm<集结直径≤60 μm时,为2个索引集结,当60 μm<集结直径≤90 μm时,为3个索引集结;以此类推,30n μm<集结直径≤30(n+1) μm时,为n+1个索引集结。

1.2.4 草地贪夜蛾PO活性测定

血淋巴采集参考 Shelby & Popham(2006)方法并略有改进。注射后24 h,每个处理随机选取草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫各4头,用70%酒精消毒腹足后置于冰上冷冻麻醉5 min,用灭菌后的26号注射针头刺破幼虫腹足,轻轻挤压腹足,让流出的血淋巴滴到预先加有50 mmol/L NaH₂PO₄缓冲液2 mL的离心管中,于4℃、7 000 g条件下离心5 min,取上清液于-80℃低温冰箱中保存,分析前解冻,每个处理重复3次。在PO活性分析前先分析血淋巴中蛋白质浓度。血淋巴中蛋白质浓度按照BCA蛋白质检测试剂盒说明书进行测定。待测血淋巴样品和标准曲线用微量滴定读板仪在490 nm波长下读取。

以L-3, 4-二羟基苯丙氨酸(L-3, 4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)为底物, PO活性测定参照Valadez-Lira et al. (2012)方法并略有改进。用pH为6.8、浓度为50 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液10 mL配制浓度为10 mmol/L的L-DOPA溶液, 备用。取50 μL 上清液(含有50 μg 蛋白质)加到96孔板井中, 在每个待测井中加入150 μL L-DOPA溶液, 用微量滴定板仪在490 nm波长下读取吸光度值(absorbance, ABS), 该值每分钟读取1次共读取了30 min。酶活性单位为 $\text{ABS}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Shelby & Popham, 2006)。

1.3 数据分析

采用SPSS 24.0软件进行数据统计分析。体重和PO活性原始数据符合正态分布和方差齐性, 同一龄期幼虫不同处理体重和PO活性之间经方差分析后采用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验; 不同龄期幼虫同一处理体重和PO活性之间采用独立样本 t 检验法进行差异显著性检验。集结数原始数据不符合正态分布和方差齐性条件, 对同一龄期幼虫不同处理集结数采用非参数检验中的Kruskal Wallis H秩和检验法进行总体分析, 若有统计学意义($P<0.05$), 进一步用该方法中的两两成对

比较法进行检验; 对不同龄期幼虫同一处理集结数之间采用两独立样本的Mann-Whitney U秩和检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 细菌注射对草地贪夜蛾幼虫体重的影响

注射大肠杆菌菌液24 h后显著影响草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫体重。注射前, 3个处理的草地贪夜蛾5龄幼虫体重之间差异不显著; 注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和CK处理的草地贪夜蛾5龄幼虫均无死亡个体, 体重分别为0.170、0.168和0.181 g, 前两者之间差异不显著, 但均显著低于CK($P<0.05$)。注射前, 3个处理的草地贪夜蛾6龄幼虫体重之间差异不显著; 注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和CK的草地贪夜蛾6龄幼虫均无死亡个体, 体重分别为0.411、0.450和0.484 g, 前者显著低于后两者($P<0.05$), 但后两者之间差异不显著(图1)。另外, 无论注射前还是注射后, 草地贪夜蛾5龄幼虫各处理体重均极显著小于6龄幼虫($P<0.01$); 与注射前各处理相比, 草地贪夜蛾5龄幼虫注射后体重变化范围明显小于6龄幼虫(图1)。

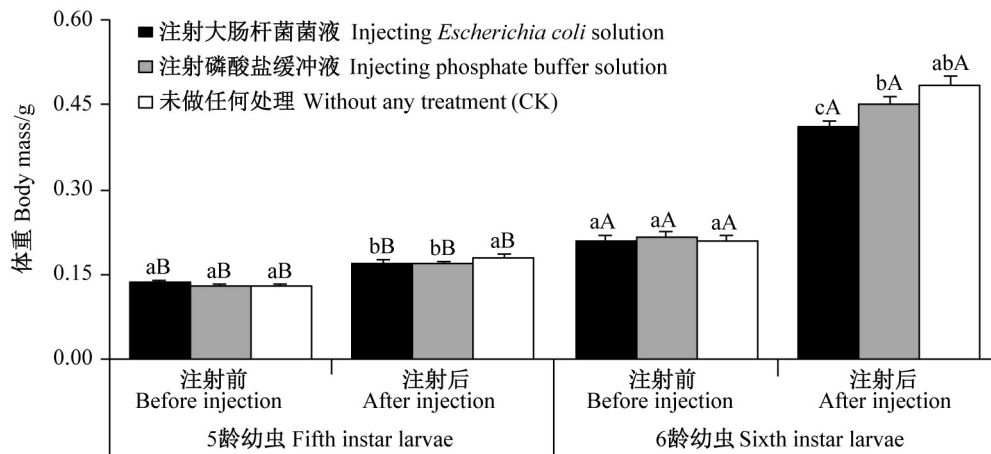


图1 细菌注射后24 h草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫的体重变化

Fig. 1 Changes of body mass in the fifth and sixth instar larvae of *Spodoptera frugiperda* at 24 h after different injection treatments

图中数据为平均数 \pm 标准误。同龄期幼虫注射前或者注射后不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。不同龄期幼虫注射前同色柱不同大写字母或注射后同色柱不同大写字母表示经两独立样本 t 检验法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data in the figure are mean \pm SE. Different lowercase letters before or after injection of the same instar larvae indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test. Different uppercase letters on the same color column before or after injection of the different instar larvae indicate significant difference at $P<0.01$ level by the two-samples t test.

2.2 细菌注射对草地贪夜蛾幼虫集结数的影响

注射大肠杆菌菌液显著影响草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫集结数。注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和CK处理的草地贪夜蛾5龄幼虫集结数分别为135.0、10.2和0.4个INs, 三者之间差异显著($P<$

0.05); 注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和CK处理的草地贪夜蛾6龄幼虫集结数分别为338.4、10.9和0.3个INs, 前两者均显著高于后者($P<0.05$), 但后两者之间差异不显著(图2)。注射大肠杆菌菌液后, 草地贪夜蛾5龄幼虫的集结数极显著低于6龄幼虫

的集结数($P<0.01$),但PBS和CK处理的草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫的集结数之间差异不显著(图2)。

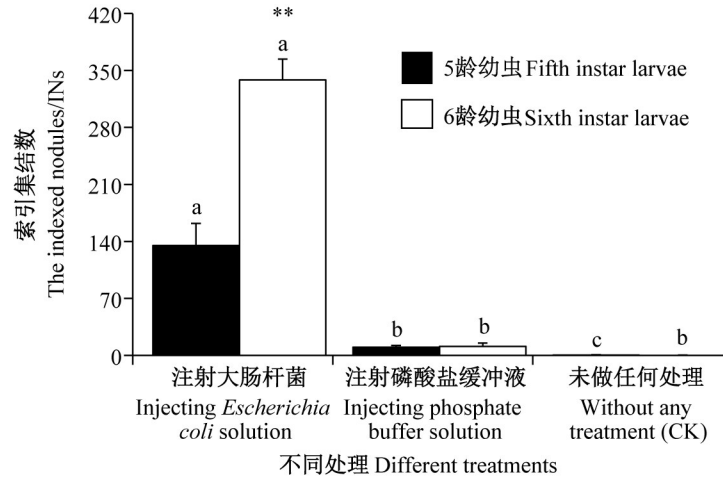


图2 细菌注射后24 h草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫的集结数

Fig. 2 The nodules in the fifth and sixth instar larvae of *Spodoptera frugiperda* at 24 h after different injection treatments

图中数据为平均数±标准误。同色柱不同小写字母表示经Kruskal Wallis H秩和检验成对比较法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。**表示同处理5龄和6龄幼虫经两独立样本Mann-Whitney U秩和检验法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the same color column indicate significant difference at $P<0.05$ level by pairwise comparison of Kruskal Wallis H rank-sum test. ** indicates significant difference of fifth and sixth instar larvae at the same treatment at $P<0.01$ level by the two-sample Mann-Whitney U rank-sum test.

2.3 细菌注射对草地贪夜蛾幼虫PO活性的影响

注射大肠杆菌菌液显著影响草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫PO活性。注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和CK处理的草地贪夜蛾5龄幼虫PO活性分别为0.156、0.066和0.046 $\text{ABS}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$,前者显著高于后两者($P<0.05$);注射24 h后大肠杆菌菌液、PBS和

CK处理的草地贪夜蛾6龄幼虫PO活性分别为0.050、0.069和0.066 $\text{ABS}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$,前者显著低于后两者($P<0.05$,图3)。注射大肠杆菌菌液后,草地贪夜蛾5龄幼虫的PO活性极显著高于6龄幼虫的活性($P<0.01$),但PBS和CK处理的草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫的PO活性之间差异不显著(图3)。

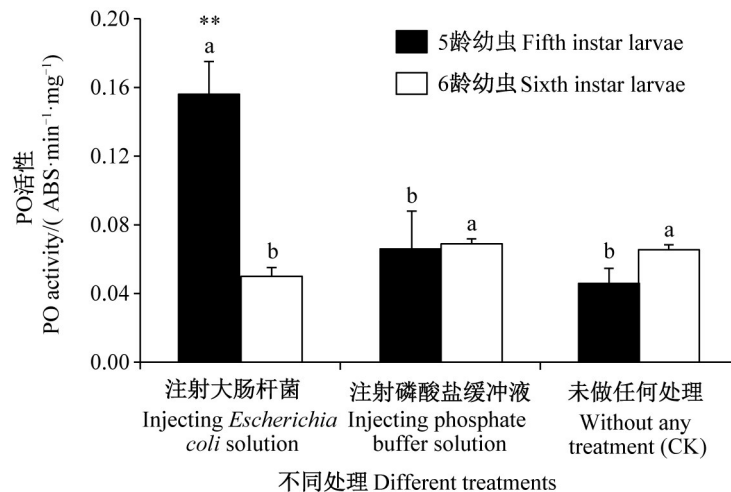


图3 细菌注射后24 h草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫的PO活性

Fig. 3 The PO activity in the fifth and sixth instar larvae of *Spodoptera frugiperda* at 24 h after different injection treatments

图中数据为平均数±标准误。同色柱不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。**表示同处理5龄和6龄幼虫经两独立样本t检验法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the same color column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test. ** indicates significant difference of fifth and sixth instar larvae at the same treatment at $P<0.01$ level by the two-samples *t* test.

3 讨论

本研究结果显示,注射大肠杆菌后会显著影响草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫体重。昆虫在受到病原微生物入侵后其生长发育减缓和体重减少,可能与其取食行为和摄食量有关(石旺鹏等,2018)。如臭腹腺蝗 *Zonocerus variegatus* 感染黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* 后,其取食行为受到了显著影响(Thomas et al., 1997);蓝胫拉剑角蝗 *Rhammatocerus schistocercoides* 若虫和成虫接种黄绿绿僵菌后,其摄食量均受到了明显影响(de Faria et al., 1999);禾草螟 *Chilo partellus* 感染球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *M. anisopliae* 后,其摄食量显著下降,从而导致生长发育减缓和体重减少(Tefera & Pringle, 2003)。另外,昆虫感染病原菌后,其体重减少也受病原菌接种剂量和食物消化过程中转换率的影响(Moore et al., 1992)。本研究结果也发现,细菌感染对草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫体重的影响程度不同,注射大肠杆菌后草地贪夜蛾5龄幼虫体重变化明显小于草地贪夜蛾6龄幼虫的体重变化,这可能与草地贪夜蛾2个龄期幼虫的生长发育规律有关。

本研究结果表明,在注射大肠杆菌后草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫血腔中集结数均急剧增加,但草地贪夜蛾6龄幼虫的集结数显著高于草地贪夜蛾5龄幼虫的集结数,说明注射大肠杆菌显著影响草地贪夜蛾的细胞免疫功能,且接种大肠杆菌后5龄和6龄幼虫血腔中参与集结形成的血细胞数量等细胞免疫特性存在差异。目前尽管昆虫抵御外来入侵生物的细胞免疫发生机制报道很少(曾令瑜等,2019),但研究表明,集结反应是响应细菌和真菌等微生物感染的主要即时细胞免疫反应,与血细胞中的颗粒细胞、浆细胞和小球细胞数量有关(吴姗和凌尔军, 2009;冯从径等,2011;陶淑霞等,2011),涉及调节类花生酸类物质合成的脂氧合酶途径(Lord et al., 2002);细胞免疫反应的相对强度可通过血腔中血细胞微团聚体数或黑化成熟的集结数体现(Howard et al., 1998)。Howard et al.(1998)指出,集结反应强度与接种细菌浓度和感染时间有关,但集结反应强度是否与幼虫龄期有关还需要更多试验验证。另外,类花生酸类物质除了与细胞免疫直接相关外(Stanley & Kim, 2014; 2019a, b),还可以调节感染细菌昆虫的类绛色细胞中PPO释放,从而影响血细胞对入侵细菌的清除作用(Shrestha & Kim, 2008),而这可

能涉及细菌入侵后寄主细胞免疫和体液免疫之间的竞争问题。

昆虫中老龄幼虫在感染细菌和真菌后其体内PO活性增加(Chan et al., 2009;冯从径等,2011),且在诱导后一定时间内该活性随诱导时间的增加而增加(张道伟和陈静,2014;杨伟克等,2019),增加到一定程度后会下降,表明PO活性与幼虫龄期和感染时间长度有关(Bali & Kaur, 2013)。本研究结果发现,注射大肠杆菌后草地贪夜蛾6龄幼虫的PO活性明显低于未注射和PBS处理,与该虫5龄幼虫结果相反,而注射大肠杆菌后草地贪夜蛾5龄幼虫的PO活性也显著高于前期试验结果(Sun & Bai, 2020),究其原因可能与该幼虫龄期发育不整齐有关。尽管本试验各处理试虫体重差异不大,但试虫个体间的发育进度仍存在明显差异,而这有可能会对试验结果产生较大影响。本研究也发现,尽管未注射或PBS处理后草地贪夜蛾5龄和6龄幼虫PO活性均无显著差异,但注射大肠杆菌后草地贪夜蛾5龄幼虫PO活性显著高于6龄幼虫PO活性。张小玉等(2006)研究结果也表明,不同龄期或发育阶段棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 血清和血细胞中PO活性存在差异,低龄幼虫PO活性要大于高龄幼虫。另外,本试验中草地贪夜蛾6龄幼虫体重增加显著高于草地贪夜蛾5龄幼虫,而这种快速增加可能会影响幼虫血淋巴免疫功能,从而使生长发育及细胞和体液免疫功能之间出现权衡现象。为了运转和维持高效免疫系统,生物有机体必须在免疫功能和生长等其它增强的适合度特性之间做出权衡;生物个体生长力增强确实会损害免疫功能,但免疫功能特性的增强并不总是影响生长(van der Most et al., 2011)。大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫被饲喂高能食物后,其幼虫体重与细胞免疫中的包被作用强度之间呈显著负相关,在其幼虫生长发育最快时生长发育和免疫功能之间存在显著竞争关系(Krams et al., 2015)。地中海蟋蟀 *Gryllus bimaculatus* 血淋巴中溶菌酶活性与该虫体型大小、发育时间呈正相关;包被作用和体液免疫中的溶菌酶活性呈负相关(Rantala & Roff, 2005)。Kirschman et al.(2017)研究进一步指出,摩门蟋蟀 *Anabrus simplex* 在模拟捕食者胁迫下包被作用和溶菌酶活性之间可能存在权衡现象。

本研究只测定了不同处理后24h草地贪夜蛾高龄幼虫对大肠杆菌的免疫应激反应,尚需更多处理后时间点的测定,从而进一步明确研究结果;草地贪夜蛾幼虫在细菌等外源生物入侵后生长发育及细胞

免疫和体液免疫功能之间的权衡现象及其机制也有待进一步深入研究;另外,为了更好地指导生产实践,需要利用生产上常用的细菌等病原微生物开展该虫免疫应激反应试验。

致谢:美国农业部农业研究局昆虫生物防治研究实验室 David Stanley 教授、Cynthia I. Goodman 博士、Joseph A. Ringbauer Jr. 博士和 Steve Saathoff 先生提供帮助,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- BALI GK, KAUR S. 2013. Phenoloxidase activity in haemolymph of *Spodoptera litura* (Fabricius) mediating immune responses challenge with entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1 (6): 118–123
- CHAN QWT, MELATHOPOULOS AP, PERNAL SF, FOSTER LJ. 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC Genomics*, 10: 387
- DE FARIA MR, ALMEIDA DO, MAGALHÃES BP. 1999. Food consumption of *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) infected by the fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28(1): 91–99
- FENG CJ, DONG QA, ZHAI HF, CHEN GB, YANG JM, MIAO JL. 2011. Immunological and stress response of the hemolymph of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) larvae to the injection of *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 54 (2): 117–126 (in Chinese) [冯从经, 董秋安, 翟会峰, 陈根宝, 杨俊明, 苗俊玲. 2011. 亚洲玉米螟幼虫应对大肠杆菌注射的血淋巴免疫应激反应. *昆虫学报*, 54(2): 117–126]
- GILLESPIE JP, KANOST MR, TRENCZEK T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611–643
- 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 (in Chinese) [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]
- HAJEK AE. 1989. Food consumption by *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae infected with *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Environmental Entomology*, 18(4): 723–727
- HOWARD RW, MILLER JS, STANLEY DW. 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology*, 44(2): 157–164
- JIN T, LIN YY, MA GC, WEN HB, MA ZL, YI KX, PENG ZQ. 2019. Control efficacy of the combinations of several conventional insecticides on fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and their economic. *Journal of Environmental Entomology*, 41(4): 766–774 (in Chinese) [金涛, 林玉英, 马光昌, 温海波, 马子龙, 易克贤, 彭正强. 2019. 常规杀虫剂组合对草地贪夜蛾的防治效果及其经济性评价. *环境昆虫学报*, 41(4): 766–774]
- KIRSCHMAN LJ, QUADE AH, ZERA AJ, WARNE RW. 2017. Immune function trade-offs in response to parasite threats. *Journal of Insect Physiology*, 98: 199–204
- KRAMS I, KECKO S, KANGASSALO K, MOORE FR, JANKEVICIS E, INASHKINAI, KRAMA T, LIETUVIETIS V, MEIJAL, RANTALA MJ. 2015. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 22(3): 431–439
- LIANG ZC, CHENG ZH. 1991. Cellular immune responses of Asian corn borer larvae *Ostrinia furnacalis*. *Acta Entomologica Sinica*, 34(2): 141–145 (in Chinese) [梁子才, 程振衡. 1991. 亚洲玉米螟幼虫血淋巴的免疫反应. *昆虫学报*, 34(2): 141–145]
- LORD JC, ANDERSON S, STANLEY DW. 2002. Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for the lipoxygenase pathway. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51: 46–54
- MOORE D, REED M, LE PATOUREL G, ABRAHAM YJ, PRIOR C. 1992. Reduction of feeding by the desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(3): 304–307
- NAPPI AJ, OTTAVIANI E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(5): 469–480
- PARK Y, KIM Y. 2003. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB): sensitive PLA2 of *Spodoptera exigua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(3): 134–142
- POLANCZYK RA, ALVES SB. 2005. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Scientia Agricola*, 62: 464–468
- RANTALA MJ, ROFF DA. 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology*, 19(2): 323–330
- SHELBY KS, POPHAM HJR. 2006. Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal. *Journal of Insect Science*, 6: 13
- SHI WP, LI AM, XING YJ, SHEN J. 2018. Effects of entomopathogens on host behavior. *Acta Microbiologica Sinica*, 58(6): 1049–1063 (in Chinese) [石旺鹏, 李傲梅, 邢永杰, 沈杰. 2018. 昆虫病原微生物对其寄主行为的调控作用研究进展. *微生物学报*, 58(6): 1049–1063]
- SHRESTHA S, KIM Y. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1): 99–112
- STANLEY D, KIM Y. 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33 (1): 20–63

- STANLEY D, KIM Y. 2019a. Insect prostaglandins and other eicosanoids: from molecular to physiological actions. *Advances in Insect Physiology*, 56: 283–343
- STANLEY D, KIM Y. 2019b. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biosynthesis and biological actions. *Frontiers in Physiology*, 9: 1927
- SUN JQ, BAI YY. 2020. Predator-induced stress influences fall armyworm immune response to inoculating bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 172: 107352
- TAO SX, LI Y, LIU JF, ZHU SR. 2011. Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* on number and encapsulation of hemocytes in *Ostrinia furnacalis* larvae. *Journal of Plant Protection*, 38(6): 527–531 (in Chinese) [陶淑霞, 李玉, 刘家富, 朱殊蕊. 2011. 球孢白僵菌对亚洲玉米螟幼虫血细胞数量和包裹作用的影响. *植物保护学报*, 38(6): 527–531]
- TEFERA T, PRINGLE KL. 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(3): 220–225
- THOMAS MB, BLANFORD S, LOMER CJ. 1997. Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7(3): 327–334
- VALADEZ-LIRA JA, ALCOCER-GONZALEZ JM, DAMAS G, NUÑEZ-MEJÍA G, OPPERT B, RODRIGUEZ-PADILLA C, TAMEZ-GUERRA P. 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science*, 12: 80
- VAN DER MOST PJ, DE JONG B, PARMENTIER HK, VERHULST S. 2011. Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology*, 25(1): 74–80
- WANG L, CHEN KW, LU YY. 2019. Long-distance spreading speed and trend predication of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in China. *Journal of Environmental Entomology*, 41(4): 683–694 (in Chinese) [王磊, 陈科伟, 陆永跃. 2019. 我国草地贪夜蛾入侵扩张动态与发生趋势预测. *环境昆虫学报*, 41(4): 683–694]
- WU C, ZHANG L, LIAO CY, WU KM, XIAO YT. 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 503–513 (in Chinese) [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛. 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和Bt作物的抗性机制及其治理技术研究进展. *植物保护学报*, 46(3): 503–513]
- WU QL, JIANG YY, WU KM. 2019. Analysis of migration routes of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) from Myanmar to China. *Plant Protection*, 45(2): 1–6, 18 (in Chinese) [吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明. 2019. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析. *植物保护*, 45(2): 1–6, 18]
- WU S, LING EJ. 2009. Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune responses in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 52(7): 791–798 (in Chinese) [吴姗, 凌尔军. 2009. 昆虫细胞免疫反应中的吞噬、集结和包裹作用. *昆虫学报*, 52(7): 791–798]
- YAN R, LIU H, HE LF, LIU L, WAN QH. 2009. Observation on cell immunity of the *Musca domestica* larva infected by *Escherichia coli*. *Sichuan Journal of Zoology*, 28(6): 827–830 (in Chinese) [晏容, 刘晖, 贺莉芳, 刘流, 万启惠. 2009. 大肠杆菌感染后家蝇幼虫的细胞免疫反应. *四川动物*, 28(6): 827–830]
- YANG WK, TANG FF, LIU ZH, ZHONG J, DONG ZP. 2019. Feeding bacteria: effect on phenoloxidase activity and its gene expression in hemolymph of *Bombyx mori*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(5): 160–164 (in Chinese) [杨伟克, 唐芬芬, 刘增虎, 钟健, 董占鹏. 2019. 喂食细菌对家蚕血淋巴酚氧化酶活性及其基因表达的影响. *中国农学通报*, 35(5): 160–164]
- ZENG LY, LI ZH, LIU LJ. 2019. Research progress in the immunity of insects and the immune mechanisms of five important invasive insects. *Journal of Plant Protection*, 46(1): 6–16 (in Chinese) [曾令瑜, 李志红, 柳丽君. 2019. 昆虫免疫及五种重要入侵昆虫免疫机制研究进展. *植物保护学报*, 46(1): 6–16]
- ZHANG DW, CHEN J. 2014. Phenoloxidase is involved in regulating immune response to *Escherichia coli* in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(10): 1123–1132 (in Chinese) [张道伟, 陈静. 2014. 酚氧化酶参与德国小蠊对大肠杆菌的免疫应答. *昆虫学报*, 57(10): 1123–1132]
- ZHANG L, RINGBAUER JA JR., GOODMAN CI, REALL T, JIANG XF, STANLEY D. 2018. Prostaglandin-mediated recovery from bacteremia delays larval development in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 97: e21444
- ZHANG XY, WANG Z, HUANG ZF, WANG GX, LIU XS. 2006. Dynamics of phenoloxidase activity in haemolymph of *Helicoverpa armigera* at different stages and instars. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 43(3): 330–332 (in Chinese) [张小玉, 汪贞, 黄泽夫, 王国秀, 刘绪生. 2006. 棉铃虫不同虫态及虫龄血淋巴中酚氧化酶活力的比较. *应用昆虫学报*, 43(3): 330–332]

(责任编辑:张俊芳)