

亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾细胞免疫反应的影响*

谢文琪** 邓晓悦 张智慧 陶文彩 李 庆 蒋春先***

(四川农业大学农学院, 成都 611130)

摘 要 【目的】明确氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫细胞免疫的亚致死效应, 探究斜纹夜蛾抵御杀虫剂胁迫的机制。【方法】以斜纹夜蛾 4 龄幼虫为研究对象, 分别用 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 的氯虫苯甲酰胺处理, 测定并分析幼虫血细胞形态、总数量以及吞噬、结节和包裹作用的变化。【结果】根据毒力测定结果, 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫处理 48 h 的 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 分别为 0.190、0.459 和 0.868 $\mu\text{g/g}$ 。亚致死浓度氯虫苯甲酰胺在一定程度上促进幼虫血细胞总数量增加。斜纹夜蛾幼虫的血细胞类型包括原血细胞、浆血细胞、粒血细胞、珠血细胞以及类绦色细胞。在亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理下, 斜纹夜蛾幼虫部分血细胞出现细胞皱缩、细胞膜变形、胞质空泡化、粒细胞脱粒及细胞核形变甚至凋亡等形态变化。LC₁₀ 氯虫苯甲酰胺在 48 h 后能抑制吞噬作用, LC₂₀ 氯虫苯甲酰胺在 12 h 后促进幼虫的吞噬作用, 在 6、48 和 72 h 显著抑制 ($P<0.01$) 吞噬作用, LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺能显著抑制斜纹夜蛾吞噬作用, 但随着处理时间增加抑制作用逐渐减弱。LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺均能显著 ($P<0.01$) 抑制斜纹夜蛾结节作用。LC₁₀ 氯虫苯甲酰胺能抑制斜纹夜蛾包裹作用, 而 LC₂₀ 和 LC₃₀ 在 12 和 24 h 会促进包裹作用, 在 72 h 显著 ($P<0.01$) 抑制。【结论】氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾细胞免疫的亚致死效应表现为改变部分血细胞形态, 一定程度上促进血细胞总数量增加, 显著抑制结节作用。此外, 随着药剂浓度和处理时间增加, 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺先促进后抑制吞噬和包裹作用。从昆虫免疫作用角度为未来害虫的控制和管理策略提供了理论依据。

关键词 斜纹夜蛾; 氯虫苯甲酰胺; 亚致死效应; 血细胞形态; 血细胞总数量; 吞噬作用; 结节作用; 包裹作用

The effect of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on the cellular immunity of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

XIE Wen-Qi** DENG Xiao-Yue ZHANG Zhi-Hui TAO Wen-Cai
LI Qing JIANG Chun-Xian***

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract [Aim] To determine the sublethal effects of chlorantraniliprole on the cellular immunity of *Spodoptera litura* larvae and explore the mechanisms of involved in insecticide resistance. [Methods] Fourth instar *S. litura* larvae were exposed to LC₁₀, LC₂₀ and LC₃₀ concentrations of chlorantraniliprole. Hemocyte morphology, total hemocyte count, phagocytosis, nodulation, and encapsulation were measured to compare the effect of different sublethal exposure doses of chlorantraniliprole on the cellular immunity of *S. litura* larvae. [Results] Based on the bioassay, the LC₁₀, LC₂₀, and LC₃₀ values of chlorantraniliprole for 4th instar *S. litura* larvae after 48 h of exposure were 0.190, 0.459, and 0.868 $\mu\text{g/g}$, respectively. A moderate increase in the total hemocyte count was observed following exposure to sublethal concentrations of

*资助项目 Supported project: 国家现代农业产业技术体系四川创新团队 (SCCXTD-2024-04)

**第一作者 First author, E-mail: wenqixie339@163.com

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

收稿日期 Received: 2023-11-13; 接受日期 Accepted: 2024-05-21

chlorantraniliprole. *S. litura* larvae have several types of hemocytes including prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, and oenocytoids. Exposure to sublethal concentrations of chlorantraniliprole resulted in various morphological changes to some hemocytes such as cell shrinkage, cell membrane deformation, vacuolation, granulocyte degranulation, cell nucleus deformation, cell nucleus apoptosis, among others. Exposure to LC₁₀ chlorantraniliprole for 48 h inhibited phagocytosis. Exposure to LC₂₀ chlorantraniliprole for 12 h promoted phagocytosis, while exposures of 6, 48, and 72 h significantly ($P < 0.01$) inhibited phagocytosis. Exposure to LC₃₀ chlorantraniliprole significantly inhibited phagocytosis, but the inhibitory effect gradually weakened with increasing treatment time. Exposure to LC₁₀, LC₂₀, and LC₃₀ chlorantraniliprole all significantly ($P < 0.01$) inhibited nodulation in *S. litura*. LC₁₀ chlorantraniliprole exposure inhibited encapsulation, while LC₂₀ and LC₃₀ promoted encapsulation after 12 and 24 h exposure. However, longer exposure times significantly inhibited encapsulation ($P < 0.01$). **[Conclusion]** The results of this study indicate that sublethal doses of chlorantraniliprole affect the hemocyte immunity of *S. litura* larvae, causing changes in larval hemocyte morphology, a moderate increase in total hemocyte count, and inhibiting nodulation. Phagocytosis and encapsulation were initially promoted, but then inhibited with increasing chlorantraniliprole concentration and treatment time. This study offers valuable information for future pest control and management strategies from the perspective of insect immunity.

Key words *Spodoptera litura*; chlorantraniliprole; sublethal effects; hemocyte morphology; hemocyte counts; phagocytosis; nodulation; encapsulation

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 在世界范围内普遍发生, 为典型的多食性害虫, 其寄主植物达 100 多科近 400 种, 包括玉米、高粱、甘薯、棉花、豆类以及十字花科蔬菜等[EFSA Panel on Plant Health (PLH) *et al.*, 2019]。斜纹夜蛾世代历期短, 繁殖能力强, 具有迁飞性, 对温度和湿度具有较强的适应能力, 易造成大面积为害(Tu *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2022)。其幼虫具有假死性和避光性, 4 龄后进入暴食期, 主要取食叶、茎和花, 严重时可吃光叶片仅留残秆, 并且可以转株为害, 严重威胁我国农业生产, 造成经济损失(许忠顺等, 2020; 张赞等, 2021)。

化学防治在害虫的应急防控中起着重要作用。氯虫苯甲酰胺属于邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂, 杀虫谱广, 对天敌低毒且环境生态安全性高, 被广泛应用于斜纹夜蛾等鳞翅目害虫防治(Selby *et al.*, 2017; 韩永强等, 2022; Anuradha *et al.*, 2023)。在化学防治过程中, 由于害虫个体接触杀虫剂的浓度存在差异, 且杀虫剂随着环境变化和时间推移会逐渐降解, 其药效可能不足以直接杀死靶标害虫, 但会对其产生亚致死效应, 从而影响杀虫剂在田间的有效使用(Shi *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Miao *et al.*, 2014)。亚致死效应常表现为对害虫的生长发育、繁殖和

生理生化指标等产生影响(马凤娟等, 2012; 申君等, 2016; 李昭等, 2018)。例如, LC₅₀ 浓度氯虫苯甲酰胺会导致斜纹夜蛾产卵量、净生殖率、内禀增长率和周限增长率显著降低, 其后代幼虫死亡率明显增加(Kong *et al.*, 2021)。LC₂₅ 剂量溴虫氟苯双酰胺处理后, 斜纹夜蛾细胞色素 P450 单加氧酶和谷胱甘肽巯基转移酶的活性显著增加(Li *et al.*, 2023)。氟雷拉纳对斜纹夜蛾的亚致死效应包括幼虫体重下降, 化蛹率和羽化率降低, 并伴随几丁质酶 5 和保幼激素酸甲基转移酶等昆虫发育关键基因的转录水平发生变化(Liu *et al.*, 2018)。由这些研究可知, 氯虫苯甲酰胺的亚致死效应包括干扰斜纹夜蛾的生长、发育、繁殖和生理生化特性, 这些亚致死效应可能对斜纹夜蛾种群的长期控制和管理产生影响。

昆虫免疫分为体液免疫和细胞免疫。细胞免疫主要是将血细胞动员到感染和伤口部位, 通过吞噬、结节和包囊作用直接与入侵的微生物细胞相互作用(Stanley *et al.*, 2023)。当昆虫受到少量小颗粒或原核细胞病原体等外源物入侵时, 血细胞识别并将其吞噬摄入细胞质内, 通过溶酶体水解酶作用分解吞噬物; 当大量小颗粒或单细胞病原体入侵时, 血细胞粘附、聚集在入侵物周围形成结节来进行免疫防御; 若外源物为真核细胞

病原体或寄生物时, 这些外源物不能被单个细胞吞噬, 大量血细胞就集结在外源物周围形成包囊, 杀灭和清除外源物 (吴姗和凌尔军, 2009; Siddiqui and Al-Khalifa, 2014)。鳞翅目昆虫血细胞类型主要有原血细胞、浆血细胞、粒血细胞、珠血细胞以及类绛色细胞 5 类 (Lavine and Strand, 2002)。其中浆血细胞与粒血细胞是参与吞噬、结节、包囊等免疫作用最重要的 2 种优势血细胞 (李蕾等, 2020)。当昆虫受到杀虫剂胁迫时, 昆虫的各类血细胞和免疫作用将发挥其功能, 共同完成保护细胞、抵御外源物入侵的任务。

昆虫免疫系统在昆虫种群的生存和繁殖中起着至关重要的作用, 相关研究发现杀虫剂会对昆虫血细胞形态、数量和细胞免疫产生亚致死效应。例如亚致死剂量除虫脲降低了小地老虎 *Agrotis ipsilon* 血细胞总数, 显著增加了浆细胞、粒细胞和珠血细胞的比例, 并且降低了原血细胞的比例 (El-Aziz and Awad, 2010)。亚致死剂量氟铃脲处理粘虫 *Mythimna separata* 幼虫发现浆血细胞丝状伪足收缩和缩短, 粒血细胞整体膨胀, 处理至 24 和 48 h 时, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 氟铃脲显著增加幼虫血细胞总数, 5 $\mu\text{g/mL}$ 氟铃脲则显著降低血细胞总数 (Huang *et al.*, 2016)。亚致死剂量有机磷类杀虫剂甲基嘧啶磷会显著增加马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 和蜡螟 *Galleria mellonella* 血细胞数量和包囊作用 (Dubovskiy *et al.*, 2013)。氟虫双酰胺能抑制菜粉蝶 *Pieris rapae* 血细胞延展力和吞噬功能 (Wu *et al.*, 2013)。目前, 有关杀虫剂对斜纹夜蛾的亚致死效应研究主要集中在其生长发育、繁殖能力、解毒酶活性以及部分基因或蛋白的表达情况 (Liu *et al.*, 2018; Un-Nisa *et al.*, 2023), 从细胞免疫的角度研究氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的亚致死效应尚缺乏系统研究。为此, 本文研究了 LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞形态、数量以及吞噬、结节、包囊作用的影响, 从细胞免疫的角度明确了亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的影响, 为未来基于免疫反应的干预措施来控制斜纹夜蛾种群提供了科学参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源与药剂

供试虫源: 斜纹夜蛾卵购买于科云-河南省济源白云实业有限公司, 在室内温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $75\%\pm 5\%$ 、光周期 14L : 10D 的条件下, 参考斜纹夜蛾近缘种草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的人工饲料配方并进行适度的改进 (李子园等, 2019), 采用改进后的人工饲料饲养多代。选取大小一致、健康活泼的 4 龄幼虫进行试验。

供试药剂: 氯虫苯甲酰胺 (95%) 原药购于杜邦中国集团有限公司, 以 99.5% 丙酮溶液为助剂溶解。

1.2 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾毒力的测定

采用饲料混药法 (吕圣兰等, 2020) 测定氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫的毒力。用 99.5% 丙酮溶液溶解 95% 氯虫苯甲酰胺原药, 随后用 0.1% Triton X-100 将原药稀释成 5 个浓度梯度, 分别取 1 mL 加入到 50 g 饲料中充分混匀。用混药饲料单头饲养斜纹夜蛾 4 龄幼虫, 每处理 3 个重复, 每重复 12 头幼虫。以 0.1% Triton X-100 水溶液饲料为空白对照, 于 48 h 后检查死亡虫数, 用毛刷轻触虫体不动者判定为死亡, 计算平均死亡率。

1.3 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞形态的影响

以 LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 氯虫苯甲酰胺的混药饲料分别饲喂幼虫 6、12、24、48 和 72 h, 每处理试虫 10 头, 空白对照处理同上。采用 Giemsa-Wright's 染色法 (毛敏等, 2017) 进行血细胞形态观察。将幼虫放置于冰上 30 min, 用酒精擦拭幼虫腹足后, 在其基部取 1 滴血淋巴滴于载玻片上涂片。待血膜干燥后, 滴加 3-4 滴甲醇用于固定血细胞并静置 4 min, 然后在室温下滴加 3-4 滴 Giemsa-Wright's 染色工作液孵育 8 min, 用蒸馏水冲洗后, 晾干封片, 在正置荧光显微镜 (ZEISS, Axio ImagerZ2, 400 $\times$) 下观察血细胞类型及形态变化。

1.4 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾血细胞总数量的影响

分别用 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺混药饲料饲喂斜纹夜蛾 4 龄幼虫, 空白对照处理同上, 每处理试虫 10 头。6、12、24、48 和 72 h 后, 将幼虫放置于冰上 30 min, 用酒精擦拭幼虫腹足后, 在其基部取 5 μ L 血淋巴, 与 10 μ L 磷酸缓冲液充分混合制成混合液。吸取 10 μ L 混合液在普通光学显微镜 (OLYMPUS, CX22) 用血球计数板进行计数 (陶淑霞等, 2011), 根据下列公式计算血细胞总数:

细胞总数 (个/mL) = $N \times 5 \times 10^4 \times$ 稀释倍数

其中, N 为血球计数板中 5 个中格中的细胞总数。

1.5 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞吞噬作用的影响

参照 Beck 和 Strand (2005) 的方法并进行修改。用 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺混药饲料饲喂斜纹夜蛾 4 龄幼虫, 空白对照处理同上, 6、12、24、48 和 72 h 后, 将幼虫放置于冰上 30 min, 用酒精擦拭幼虫腹足后, 每头虫收集 10 μ L 血淋巴, 加入血淋巴 2 倍体积的预冷生理盐水 (含苯基硫脲) 进行稀释。取 20 μ L 稀释后的血淋巴涂布于载玻片上, 放于保湿盒中, 28 $^{\circ}$ C 延展 20 min。将浓度为 1×10^{10} 个/mL 带绿色荧光蛋白质粒的 DH5 α 大肠杆菌 *Escherichia coli* 滴加一滴在载玻片上涂有血细胞的区域, 置于保湿盒中, 28 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。取出载玻片, 每个载玻片滴加 100 μ L 0.4% 台盼蓝染色 5 min, 用 $1 \times$ PBS 缓冲液 (pH 7.2-7.4) 轻轻冲洗 2 遍。每个处理重复 5 次。封片后在正置荧光显微镜 (400 $\times$) 下随机统计 150 个细胞吞噬的情况, 按以下公式计算吞噬率:

吞噬率 = (发生吞噬的血细胞数量/血细胞总数量) $\times$ 100%。

1.6 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞结节作用的影响

参照倪若尧等 (2018) 的方法并进行修改, 分别用 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺混药饲料

饲喂斜纹夜蛾 4 龄幼虫, 空白对照处理同上, 每处理试虫 5 头。6、12、24、48 和 72 h 后, 在冰上放置幼虫 30 min, 向每头试虫注射 1×10^7 个/mL 的 DH5 α 大肠杆菌 1 μ L, 在培养箱继续培养 3 h 后, 在体式解剖镜 (OLYMPUS, SZ) 下解剖试虫并观察和统计结节数量。结节为随血淋巴流动或者粘附在中肠和脂肪体上的黑色碎砂或黑斑。

1.7 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞包裹作用的影响

参照 Hu 等 (2003) 的方法, 分别用 LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺混药饲料饲喂斜纹夜蛾 4 龄幼虫, 空白对照处理同上, 每处理试虫 10 头。6、12、24、48 和 72 h 后, 将幼虫放置于冰上 30 min, 用酒精擦拭幼虫腹足后, 向幼虫注射刚果红染色的葡聚糖凝胶珠大约 30 粒。24 h 后, 在体式解剖镜下解剖斜纹夜蛾幼虫, 取出全部葡聚糖凝胶珠放于磷酸缓冲液中。在正置荧光显微镜 (200 $\times$) 下观察凝胶珠的包裹形成情况并测量包裹的厚度 (L) 和凝胶珠直径 (D)。参照 Hu 等 (2017) 的研究并做一些修改, 将凝胶珠的包裹等级分成 13 个等级: 1 级: 凝胶珠未被包裹或仅有少量细胞黏附; 2 级: 凝胶珠未被完全包裹; 3 级: $0 < L/D \leq 0.1$; 4 级: $0.1 < L/D \leq 0.2$; 以此类推, 13 级为 $L/D > 1$ 。计算包裹指数: 包裹指数 = $\sum (i \times P_i)$, i 代表珠子包裹等级 (1, 2, ..., 13), P_i 代表第 i 级珠子占珠子总数的比例。

1.8 数据分析

运用 DPS 软件 (Version 19.05) 求出毒力回归方程, LC₁₀、LC₂₀、LC₃₀、LC₅₀ 值及 95% 的置信区间等。通过 SPSS 20 软件进行统计学分析, 处理间差异分析采用单因素方差分析, 再采用 LSD 多重比较分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 认为有统计学意义差异, ns 认为无统计学意义差异。统计图表由 Origin 2019b 创建。

2 结果与分析

2.1 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的毒力测定

氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾的毒力测定结果

见表 1, 通过饲料混药法测得斜纹夜蛾的毒力回归方程为 $y = 4.546 + 1.147x$, LC_{50} 为 $2.486 \mu\text{g/g}$, LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 分别为 0.190 、 0.459 和 $0.868 \mu\text{g/g}$ 。

2.2 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞形态变化的影响

2.2.1 斜纹夜蛾血细胞类型 观察未经亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理的斜纹夜蛾幼虫血细胞发现血细胞类型有 5 种: 原血细胞、浆血细胞、粒血细胞、珠血细胞以及类绦色细胞。原血细胞经染色后为紫红色, 其形态单一, 多为圆形或者

椭圆形。细胞核较大, 直径 $10\text{--}13 \mu\text{m}$, 单核。有的原血细胞有一层很薄的细胞质, 有的则几乎看不见 (图 1: A)。浆血细胞经染色后细胞质变为蓝紫色, 细胞核变为紫红色。浆血细胞大小 $(10\text{--}17 \mu\text{m}) \times (15\text{--}30 \mu\text{m})$, 形状有不规则形、星形或梭形等, 部分伸出伪足, 其细胞核直径 $8\text{--}12 \mu\text{m}$ (图 1: B, C)。粒血细胞经染色后细胞质蓝紫色, 细胞核变为紫红色。粒血细胞大小 $(5\text{--}10 \mu\text{m}) \times (10\text{--}14 \mu\text{m})$, 形状有不规则形、卵圆形、圆形和纺锤形等, 其细胞核直径 $8\text{--}10 \mu\text{m}$ 。细胞质中含有嗜酸性的红色颗粒或嗜碱性的蓝色颗粒, 颗粒大小不一, 分布稀疏不等 (图 1: D)。

表 1 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫的毒力
Table 1 Toxicity of chlorantraniliprole to 4th instar larvae of *Spodoptera litura*

LC_{50} (95%置信限) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{10} (95%置信限) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{20} (95%置信限) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{30} (95%置信限) ($\mu\text{g/g}$)	卡方值 χ^2 Chi-square	相关系数 R^2 Correlation coefficient
LC_{50} (95% CI) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{10} (95% CI) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{20} (95% CI) ($\mu\text{g/g}$)	LC_{30} (95% CI) ($\mu\text{g/g}$)		
2.486 (1.238-3.741)	0.190 (0.018-0.523)	0.459 (0.079-0.995)	0.868 (0.229-1.600)	2.766	0.945

CI = Confidence intervals.

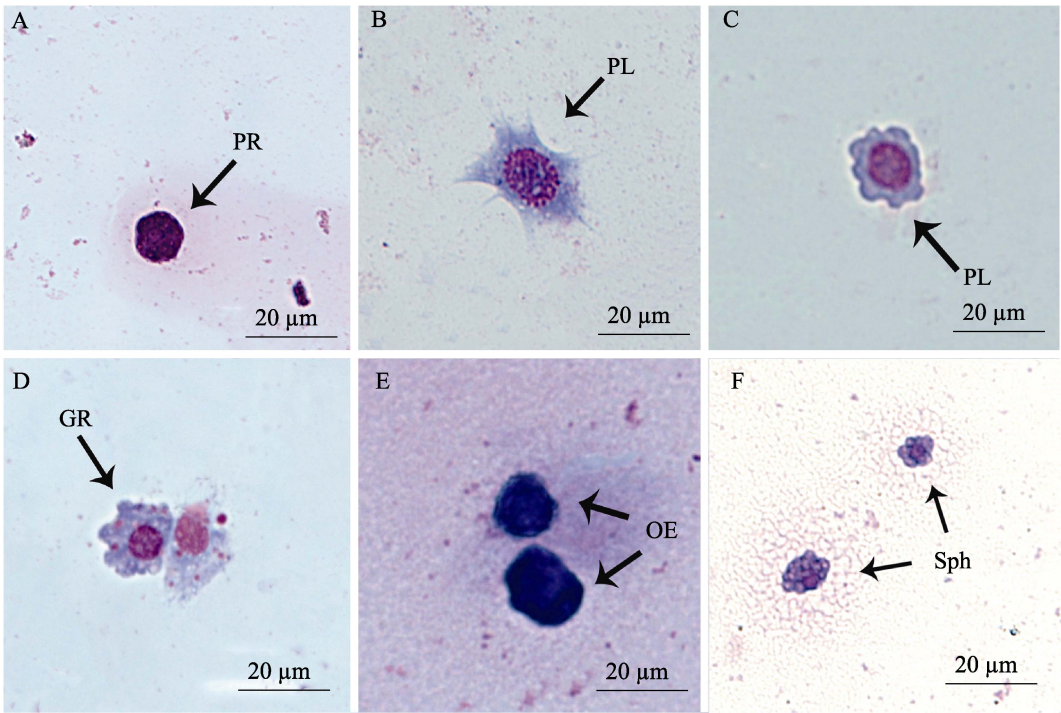


图 1 斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞类型

Fig. 1 Types of hemocytes in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura*

A. 原血细胞 (PR); B 和 C. 浆血细胞 (PL); D. 粒血细胞 (GR); E. 类绦色细胞 (OE); F. 珠血细胞 (Sph)。
A. Prohemocytes (PR); B and C. Plasmatocytes (PL); D. Granulocytes (GR); E. Oenocytoids (OE); F. Spherulocytes (Sph).

类绛色细胞经染色后变为蓝色或蓝紫色,它是一种大型的血细胞,形状有圆形、葫芦形等。细胞核直径 5-10 μm 。部分细胞质中有颗粒物或透明的囊泡(图 1: E)。珠血细胞经染色细胞核变为紫红色,细胞质变为紫色。珠血细胞大小(4-6 μm) $\times$ (10-12 μm),形状有卵圆形或圆形。细胞质中含有大小不一的囊泡,整个细胞看起来由很多小泡组成(图 1: F)。

2.2.2 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾血细胞形态的影响

LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲

酰胺处理后,斜纹夜蛾幼虫部分血细胞形态发生变化,与对照组相比,出现细胞膜变形、胞质空泡化、细胞皱缩、粒细胞脱粒、细胞核形变和细胞核凋亡等现象,即部分血细胞的细胞膜形状发生变化,甚至破裂(图 2: A, B);一些细胞的胞质空泡化,出现大小不一的空泡,将细胞核挤到边缘(图 2: C, D);部分血细胞出现皱缩(图 2: E, F);部分粒细胞出现脱粒现象,表现为红色颗粒(嗜酸性)或蓝色颗粒(嗜碱性)从其细胞质中流出,散在细胞周围;部分细胞核

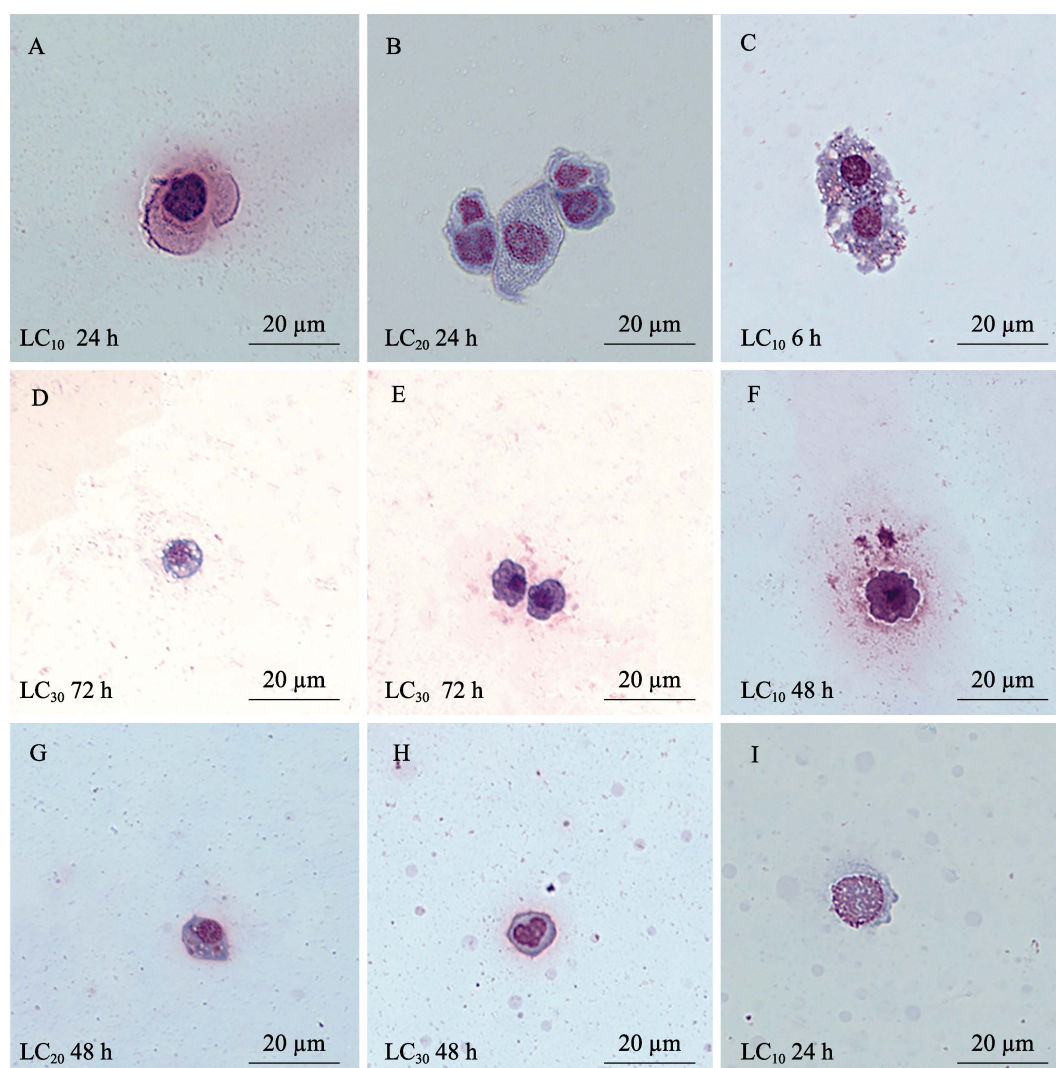


图 2 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞形态的影响

Fig. 2 Morphology of hemocytes in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after being exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole

A 和 B. 细胞膜变形; C 和 D. 空泡化; E 和 F. 细胞皱缩; G. 粒血细胞的脱粒现象;

H. 细胞核变形; I. 细胞核凋亡。

A and B. Membrane deformation; C and D. Vacuolation; E and F. Cell shrinkage; G. Degranulation; H. Cell nucleus deformation; I. Cell nucleus apoptosis.

出现溶血现象 (图 2: G); 部分细胞细胞核边缘出现褶皱, 形状变得不规则 (图 2: H); 一些血细胞会出现细胞核凋亡现象 (图 2: I)。

2.3 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞总数的影响

由图 3 可知, LC_{10} 的氯虫苯甲酰胺处理下, 6、12、24 和 72 h 时血细胞总数均显著 ($P<0.01$) 高于对照, 在 24 h 时血细胞总数量达到了最高水平。 LC_{20} 的氯虫苯甲酰胺处理 24、48 和 72 h 时, 幼虫血细胞总数量均显著 ($P<0.01$) 高于对照组, 在 72 h 时血细胞总数量达到了最高。 LC_{30} 的氯虫苯甲酰胺处理 48 h 时, 血细胞总数量显著高于对照组 ($P<0.05$), 在 6 和 72 h 时, 血细胞总数量极显著高于对照组 ($P<0.01$), 同样在 72 h 时血细胞总数量达到了最高。与对照组相比, LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 的氯虫苯甲酰胺处理后, 幼虫的血细胞总数量均有所增加, 特别是在 72 h 时, 血细胞总数量均显著 ($P<0.01$) 增加。

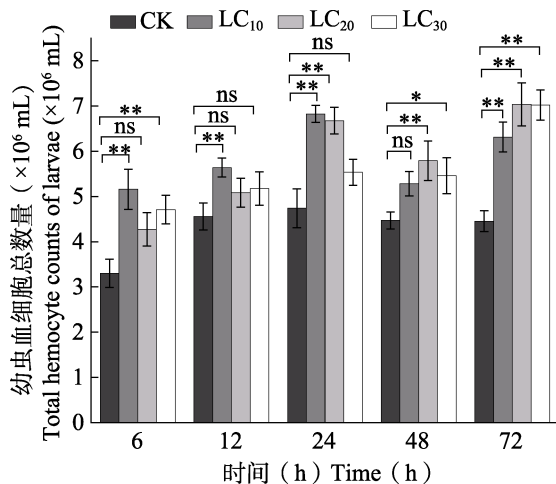


图 3 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞总数的影响

Fig. 3 Total hemocyte counts in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after being exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole

图中数据为平均数 ± 标准差。柱上标有星号表示差异显著 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$), ns 表示差异不显著。采用单因素方差分析和 LSD 多重比较分析。下同。

Data in the figure are mean ± SD. Histograms with asterisk indicate significant difference (* $P<0.05$, ** $P<0.01$), ns indicates no significant difference. Using one-way ANOVA and LSD multiple comparison analysis. The same below.

2.4 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞吞噬作用的影响

斜纹夜蛾幼虫血细胞的吞噬作用可以通过观察细胞内是否含有带绿色荧光蛋白质粒的 DH5a 大肠杆菌 *E. coli*, 若含有细胞出现荧光, 不含则无荧光 (图 4: B, C)。从图 4 (A) 中可以看出, LC_{10} 的氯虫苯甲酰胺处理至 48 和 72 h 时, 吞噬率显著 ($P<0.01$) 低于对照组, 在 72 h 时最低, 此时吞噬率为 36.12%, 而对照为 57.33%。 LC_{20} 的氯虫苯甲酰胺处理下, 幼虫血细胞的吞噬率在 12 h 时显著 ($P<0.01$) 高于对照组, 其余时间点均低于对照组, 且 6、48 和 72 h 时表现为显著 ($P<0.01$) 降低, 同样在 72 h 最低, 此时吞噬率为 37.67%。 LC_{30} 处理下, 所有时间点幼虫血细胞的吞噬率均显著 ($P<0.01$) 低于对照组, 但随时间增加吞噬率呈现缓慢上升的趋势。总体上, 在 LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 的氯虫苯甲酰胺处理 24 h 后, 斜纹夜蛾血细胞的吞噬能力低于同期未处理的幼虫。

2.5 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞结节作用的影响

如图 5 所示, 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理后, 斜纹夜蛾幼虫的结节数量均低于对照组。除 LC_{20} 的氯虫苯甲酰胺处理 24 h 时, 斜纹夜蛾血细胞的结节数量与对照组没有显著 ($P>0.05$) 差异外, 其他处理组结节数量均显著 ($P<0.01$) 低于对照组。以上结果表明, LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 的氯虫苯甲酰胺可以显著抑制斜纹夜蛾幼虫结节作用。

2.6 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫血细胞包裹作用的影响

幼虫血细胞对凝胶珠的包裹等级为 1-6 级 (图 6: B-G)。 LC_{10} 的氯虫苯甲酰胺处理下, 不同时间的幼虫血细胞包裹指数均低于对照组, 其中 48 h 时, 包裹指数显著低于对照组 ($P<0.05$) 6 和 72 h 的包裹指数极显著低于对照组 ($P<0.01$)。 LC_{20} 和 LC_{30} 的氯虫苯甲酰胺处理下, 72 h 时的幼虫血细胞包裹指数均显著 ($P<0.01$)

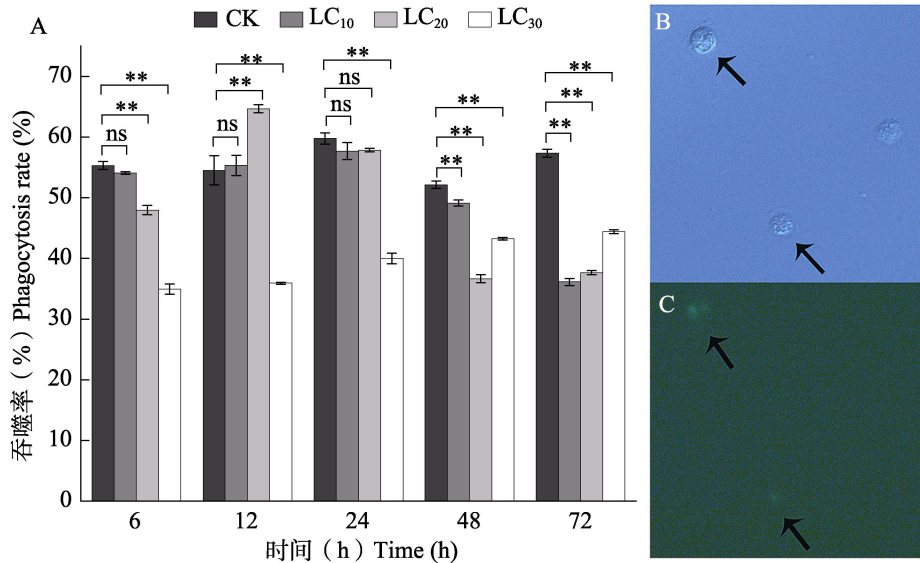


图 4 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫吞噬作用的影响

Fig. 4 Phagocytosis in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after being exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole

A. 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理下不同时间的斜纹夜蛾 4 龄幼虫吞噬率; B. 细胞 DIC 图像;

C. 细胞 FITC 荧光图像。箭头为发生吞噬作用显现荧光的细胞。

A. Phagocytosis rate in the 4th instar larvae of *S. litura* exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole that treated at different times; B. Cell DIC image;

C. FITC fluorescent image. Arrows are phagocytosis occurs in cells that showing fluorescence.

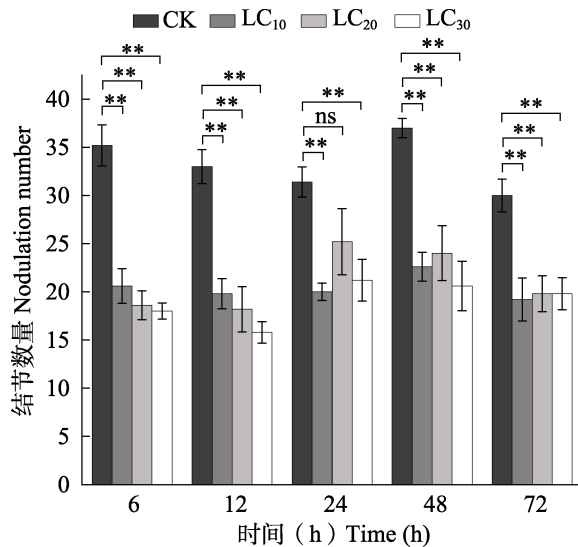


图 5 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫结节作用的影响

Fig. 5 Nodulation in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after being exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole

低于对照组, 12 和 24 h 时包囊指数显著 ($P < 0.01$) 高于对照组。LC₂₀ 和 LC₃₀ 处理组的血细胞包囊指数都在 24 h 时最高, 分别为 4.475 和 3.975,

而对照为 3.125 (图 6: A)。综上所述, LC₁₀ 的氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾包囊作用有抑制作用。LC₂₀ 和 LC₃₀ 的氯虫苯甲酰胺在 12 和 24 h 会促进斜纹夜蛾包囊作用, 之后则能抑制包囊作用。

3 讨论

昆虫的免疫系统在外源物刺激下会做出一系列防御反应, 化学杀虫剂就是刺激昆虫反应的外源物之一。由于杀虫剂在田间降解, 杀虫剂对靶标害虫生长发育、繁殖和生理生化产生的亚致死效应成为越来越多研究的主题。本研究从免疫角度出发, 探究氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫的亚致死效应。研究发现, 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺会使斜纹夜蛾幼虫部分血细胞出现细胞皱缩、细胞膜变形、胞质空泡化、粒细胞脱粒、细胞核形变甚至凋亡等形态变化, 同时一定程度上还会促进幼虫血细胞总数量增加。对于免疫作用, LC₁₀ 的氯虫苯甲酰胺在 48 h 后能抑制吞噬作用, LC₂₀ 处理在 12 h 促进吞噬作用, 6、48 和 72 h 显著抑制吞噬作用, LC₃₀ 的氯虫苯甲酰

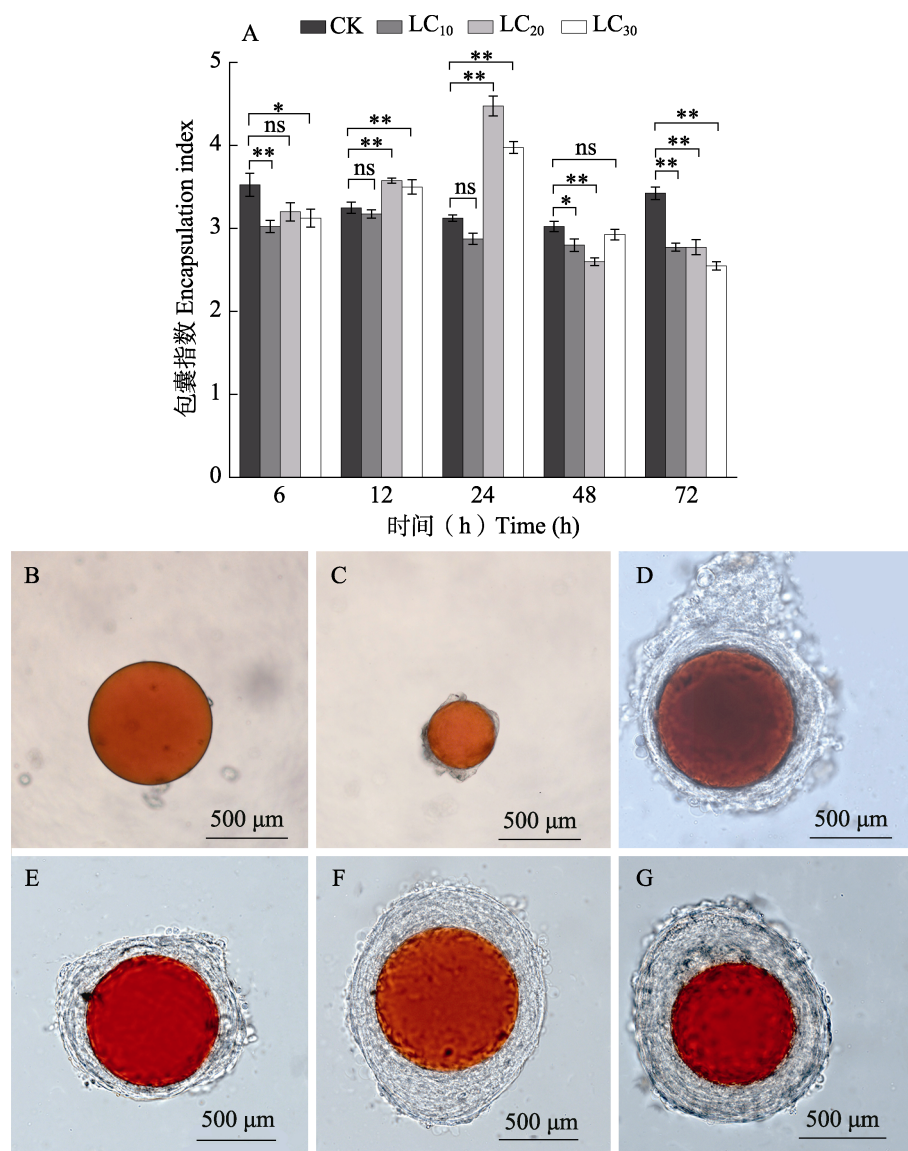


图 6 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾 4 龄幼虫包裹作用的影响

Fig. 6 Encapsulation in the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after being exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole

A. 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理下不同时间的斜纹夜蛾 4 龄幼虫包裹指数; B. 包裹等级 1 级; C. 包裹等级 2 级; D. 包裹等级 3 级; E. 包裹等级 4 级; F. 包裹等级 5 级; G. 包裹等级 6 级。

A. Encapsulation index in the 4th instar larvae of *S. litura* exposed to sublethal concentrations of chlorantraniliprole that treated at different times; B. Encapsulation grade 1; C. Encapsulation grade 2; D. Encapsulation grade 3; E. Encapsulation grade 4; F. Encapsulation grade 5; G. Encapsulation grade 6.

胺能显著抑制斜纹夜蛾吞噬作用,但随着处理时间增加抑制作用逐渐减弱。LC₁₀、LC₂₀ 和 LC₃₀ 的氯虫苯甲酰胺均能显著抑制斜纹夜蛾结节作用。LC₁₀ 的氯虫苯甲酰胺能抑制斜纹夜蛾包裹作用,而 LC₂₀ 和 LC₃₀ 的氯虫苯甲酰胺在 12 和 24 h 会促进斜纹夜蛾包裹作用,此后则能显著抑制包裹作用。这些结果有助于了解氯虫苯甲酰胺对斜

纹夜蛾免疫作用的亚致死效应,并为未来的害虫控制和管理策略提供有价值的信息。

昆虫血细胞是细胞免疫的主要承担者,在受到杀虫剂胁迫时血细胞发挥相应的免疫功能,其形态和数量在此过程中也会受到杀虫剂的影响 (James and Xu, 2012)。本研究发现,亚致死浓度氯虫苯甲酰胺会造成斜纹夜蛾幼虫部分血细

胞出现皱缩,细胞膜发生形变,胞质空泡化,细胞核变为多个小球而凋亡,及粒血细胞细胞质中的颗粒物流出等现象。 LC_{50} 浓度的香茅处理红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 24 h 后,同样出现了胞质空泡,还有一些裂解的细胞质和细胞核,随着处理时间增加,细胞甚至会完全溶解 (Al Dawsari and Alam, 2022)。本研究还发现亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理后的斜纹夜蛾幼虫血细胞总数量相比于对照组均有不同程度的增加。在 48 h 出现血细胞数量的整体减少可能是由于斜纹夜蛾幼虫正处于蜕皮期,鳞翅目幼虫的血细胞总数量在蜕皮前后会出现明显波动 (Okazaki *et al.*, 2006; Yamamura *et al.*, 2011)。本研究中 24-72 h 之间斜纹夜蛾幼虫已经进入蜕皮期,但亚致死浓度氯虫苯甲酰胺处理的幼虫蜕皮时间较对照组明显延长,到 48 h 对照组幼虫已经完成蜕皮进入 5 龄,但其他处理组幼虫还处于 4 龄末期或即将蜕皮的状态,因此推测血细胞总数量出现了整体降低的趋势与亚致死浓度氯虫苯甲酰胺影响幼虫蜕皮过程有关。根据 Zhu 等 (2012) 的研究表明,亚致死浓度氟铃脲处理斜纹夜蛾幼虫 24 h,血细胞总数量被显著促进增加,而处理到 96 h,血细胞总数量的正常增加被抑制。Zhu 等 (2012) 认为 24 h 的促进作用可能是因为粘附在血腔内表面上的血细胞释放,而 96 h 的抑制则是因为亚致死氟铃脲影响了幼虫造血功能。所以本研究中出现血细胞总数量增加可能与亚致死浓度氯虫苯甲酰胺促进血细胞的大量释放有关,但本研究中氯虫苯甲酰胺处理仅至 72 h,随处理时间延长是否对斜纹夜蛾幼虫血细胞数量有抑制作用还需进一步实验,对于促进机制也需要更多探索。

粒血细胞与浆血细胞是昆虫吞噬作用的主力,参与吞噬作用的浆血细胞和粒血细胞在细胞表面受体识别外源异物后,将信号向胞内传递引起胞膜的活化,细胞伸出伪足进行延展,包住并内化外源异物 (Wu *et al.*, 2016; 李蕾等, 2020)。浆血细胞和粒血细胞的能力受到限制则会影响正常的吞噬作用 (Wrońska and Boguś, 2019)。本研究发现 LC_{10} 和 LC_{30} 氯虫苯甲酰胺均抑制幼虫的吞噬作用,但随着时间增加, LC_{30} 处理下的

幼虫吞噬作用在缓慢恢复, LC_{20} 氯虫苯甲酰胺在 12 h 促进斜纹夜蛾吞噬作用, 12 h 后则显著抑制吞噬作用。冠耳霉感染蜡螟 *G. mellonella* 和松毛虫 *Dendrolimus pini* 后,使两者浆细胞的吞噬活性分别增加 3.3 和 2.1 倍, Kędra 和 Boguś (2006) 推测原因是真菌刺激了昆虫机体产生免疫反应,这可能也是本研究在 12 h LC_{20} 的氯虫苯甲酰胺促进幼虫吞噬作用的原因。亚致死剂量氟铃脲会抑制粘虫血细胞吞噬能力,但随着处理时间增加,浆血细胞和粒血细胞吞噬能力逐渐恢复,表明吞噬功能的降低是可逆的 (Huang *et al.*, 2016)。本研究中, LC_{30} 处理出现吞噬率逐渐上升也可以证实这一结论。黄芳等 (2011) 发现半闭弯尾姬蜂寄生小菜蛾 *Diadegma semiclausum* 幼虫后短时间内,幼虫的功能血细胞延展受到抑制,无法进一步吞噬外源物,寄生后 24 h,功能血细胞的延展力恢复,粒血细胞的吞噬作用可顺利完成,推测具有噬菌功能的颗粒血细胞表面的外源物识别受体并没有受到寄生因子的破坏,但因血细胞的细胞膜无法延展而进行重构内陷,从而阻碍了噬菌过程完成。本研究中吞噬作用恢复是否也是该原因还需针对浆血细胞和粒血细胞进行研究。

昆虫结节形成分为两个阶段,第一阶段涉及血细胞诱导的反应,由血淋巴中的病原相关分子模式识别蛋白触发,丝氨酸蛋白酶级联、细胞因子和 Toll 信号通路调节;第二阶段涉及浆细胞与第一阶段产生的黑化聚集体附着 (Sato, 2023)。在本研究中发现, LC_{10} 、 LC_{20} 和 LC_{30} 氯虫苯甲酰胺处理下斜纹夜蛾幼虫结节作用都被显著抑制,且解剖过程中发现,经氯虫苯甲酰胺处理斜纹夜蛾幼虫脂肪体大量减少。Satyavathi 等 (2014) 提出昆虫的脂肪体参与结节形成。脂肪体是物质存储和中间代谢的组织,存在大量微粒体,多种抗菌肽的合成和酚氧化酶级联反应的激活都在脂肪体中完成 (Kanost *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2008)。因此,结合结节作用的形成过程推测,亚致死浓度氯虫苯甲酰胺降低了斜纹夜蛾幼虫脂肪体含量,影响了与结节作用相关的抗菌肽、酚氧化酶等因子介导的反应,从而导致结节作用被显著抑制。但本研究中未对脂肪体含量进

行定量测定, 结节作用与脂肪体的关系还需要进一步研究。

昆虫的包裹作用是通过粒血细胞接触到外源物识别为“异己”并粘附, 再释放出识别因子以吸引浆血细胞附着, 浆血细胞间形成粒桥及微管层层埋集, 形成包裹 (Grizanov *et al.*, 2018)。本研究中, LC₁₀ 氯虫苯甲酰胺对斜纹夜蛾幼虫包裹作用有抑制作用; 在 12 和 24 h, LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺会增强幼虫的包裹作用, 但随着时间增加, 包裹作用被显著抑制。在 Dubovskiy 等 (2013) 用亚致死浓度有机磷杀虫剂处理后, 马铃薯甲虫包裹率提高 1.5-1.7 倍, 而蜡螟增加 1.2-1.3 倍, 这与本研究中 12 和 24 h LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺会增强幼虫的包裹作用结果相似, 这可能是因为斜纹夜蛾幼虫对 LC₂₀ 和 LC₃₀ 氯虫苯甲酰胺敏感性较强, 可迅速增加血细胞包裹作用以抵御氯虫苯甲酰胺的危害 (夏婧等, 2014)。除此之外, 氯虫苯甲酰胺作用于昆虫鱼尼丁受体, 促使过量 Ca²⁺ 释放, Ahmed 和 Kim (2021) 的研究发现, Ca²⁺ 通量抑制显著降低血细胞延展能力, 而氯虫苯甲酰胺导致的 Ca²⁺ 持续释放, 可能增强了血细胞延展能力, 从而促进幼虫的包裹作用。但氯虫苯甲酰胺会造成粒血细胞脱粒和细胞质空泡化等现象, 破坏粒血细胞和浆血细胞正常的识别、延展和粘附能力, 使得两者无法正常完成包裹作用, 因此后期幼虫的包裹作用被抑制。

本研究结果表明, 斜纹夜蛾在应对亚致死浓度杀虫剂胁迫时, 其细胞免疫会积极发挥作用保护机体, 若是长期处于这种刺激, 斜纹夜蛾对氯虫苯甲酰胺的免疫作用可能逐渐增强。因此, 在田间综合治理过程中, 应结合实际情况衡量杀虫剂的使用浓度, 避免刺激靶标害虫产生抗药性。此外, 本研究也发现亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对不同免疫作用的影响有差异, 探究这些差异背后的作用机制有助于深入理解斜纹夜蛾对杀虫剂胁迫的适应机制, 为制定有效防控斜纹夜蛾的策略提供重要参考。

参考文献 (References)

- Ahmed S, Kim Y, 2021. PGE₂ mediates hemocyte-spreading behavior by activating aquaporin via cAMP and rearranging actin cytoskeleton via Ca²⁺. *Developmental and Comparative Immunology*, 125: 104230.
- Al Dawsari MM, Alam P, 2022. Disruption impact of citronella and menthol insecticides on adults behavior and hemocytes morphology in the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* “Oliver” (Coleoptera: Curculionidae). *Science Progress*, 105(1): 003685042210794.
- Anuradha P, Madhu Sudhanan E, Priyanka M, Emaiya R, Karthik P, Suganthi A, Krishnamoorthy SV, 2023. Determination of chlorantraniliprole for managing *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* in cotton ecosystem. *Environmental Research*, 239(1): 117301.
- Beck M, Strand MR, 2005. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. *Journal of Virology*, 79(3): 1861–1870.
- Dubovskiy IM, Yaroslavl'tseva ON, Kryukov VY, Benkovskaya GV, Glupov VV, 2013. An increase in the immune system activity of the wax moth *Galleria mellonella* and of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under effect of organophosphorus insecticide. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(6): 592–596.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Bragard C, Dehnen-Schmutz K, Di Serio F, Gonthier P, Jacques M, Jaques Miret JA, Justesen AF, Magnusson CS, Milonas P, Navas-Cortes JA, Parnell S, Potting R, Reignault PL, Thulke H, Van der Werf W, Vicent Civera A, Yuen J, Zappalà L, Malumphy C, Czwieneczek E, MacLeod A, 2019. Pest categorisation of *Spodoptera litura*. *EFSA Journal*, 17(7): e05765.
- El-aziz NMA, Awad HH, 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*, 41(3): 203–209.
- Grizanov EV, Semenova AD, Komarov DA, Chertkova EA, Slepneva IA, Dubovskiy IM, 2018. Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 98(4): e21460.
- Han YQ, Li DD, Deng QQ, Wang LJ, Hou ML, 2022. Control of the rice stem borer and rice leaf folder using the seed dressing agent chlorantraniliprole. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(5): 1160–1172. [韩永强, 李丹丹, 邓权权, 王龙江, 侯茂林, 2022. 50%氯虫苯甲酰胺悬浮剂拌种对二化螟和稻纵卷叶螟的防治效果. 应用昆虫学报, 59(5): 1160–1172.]
- He YX, Zhao JW, Zheng Y, Desneux N, Wu KM, 2012. Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the white fly *Bemisia tabaci*. *Ecotoxicology*, 21(5): 1160–1172.

- 1291–1300.
- Hu J, Zhu XX, Fu WJ, 2003. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 49(4): 367–375.
- Hu QQ, Wei XH, Li YP, Wang JL, Liu XS, 2017. Identification and characterization of a gene involved in the encapsulation response of *Helicoverpa armigera* haemocytes: Identification of an encapsulation-related gene. *Insect Molecular Biology*, 26(6): 752–762.
- Huang F, Shi Y, Chen XX, Zhang JM, 2011. Effect of parasitism by *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its venom on the phagocytic ability of hemocytes from *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 54(9): 989–996. [黄芳, 时敏, 陈学新, 章金明, 2011. 半闭弯尾姬蜂寄生及其毒液对小菜蛾幼虫血细胞吞噬作用的影响. 昆虫学报, 54(9): 989–996.]
- Huang QC, Zhang L, Yang C, 2016. The competence of hemocyte immunity in the armyworm *Mythimna separata* larvae to sublethal hexaflumuron exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130: 31–38.
- James RR, Xu J, 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2): 175–182.
- Jiang S, Fu XW, Jiang SS, Yang XM, Zhao HY, Wu KM, 2022. Effect of X-ray irradiation on development, flight, and reproduction of *Spodoptera litura*. *Frontiers in Physiology*, 13: 947848.
- Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198(1): 97–105.
- Kędra E, Boguś MI, 2006. The influence of *Conidiobolus coronatus* on phagocytic activity of insect hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1): 50–52.
- Kong FF, Song YQ, Zhang Q, Wang ZY, Liu YQ, 2021. Sublethal effects of chlorantraniliprole on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) moth: Implication for attract-and-kill strategy. *Toxics*, 9(2): 20.
- Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10): 1295–1309.
- Li L, Zhang L, Li SG, 2020. Research frontiers of hemocytes functions, morphology and cellular immune response in insects. *Journal of Environmental Entomology*, 42(5): 1112–1120. [李蕾, 张雷, 李世广, 2020. 昆虫血细胞功能、形态及细胞免疫反应研究前沿. 环境昆虫学报, 42(5): 1112–1120.]
- Li YY, Cheng Q, Zhang QH, Zhang LP, Luo C, Wang R, 2023. Baseline susceptibility, cross-resistance, and sublethal effects of broflanilide, a novel meta-diamide pesticide, in *Spodoptera litura*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6): 5351.
- Li Z, Guo Y, Liu Y, Wang XP, Zhu ZH, 2018. The effects of sublethal levels of insecticide on the wing dimorphism, development and reproduction of two aphid species. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(5): 896–903. [李昭, 郭圆, 刘勇, 王小平, 朱智慧, 2018. 亚致死剂量杀虫剂对两种蚜虫翅型、发育和生殖的影响. 应用昆虫学报, 55(5): 896–903.]
- Li ZY, Dai QX, Kuang ZL, Liang MR, Wang L, Lu YY, Chen KW, 2019. Effects of three artificial diets on development and reproduction of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Journal of Environmental Entomology*, 41(6): 1147–1154. [李子园, 戴钊萱, 邝昭琅, 梁铭荣, 王磊, 陆永跃, 陈科伟, 2019. 3 种人工饲料对草地贪夜蛾生长发育及繁殖力的影响. 环境昆虫学报, 41(6): 1147–1154.]
- Liu D, Jia ZQ, Peng YC, Sheng CW, Tang T, Xu L, Han ZJ, Zhao CQ, 2018. Toxicity and sublethal effects of fluralaner on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152(1): 8–16.
- Lü SL, Wang YB, Gu SH, Liang P, Zhang L, Gao XW, 2020. Comparison of bioassay methods for the toxicities of chemical insecticides against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 63(5): 590–596. [吕圣兰, 王有兵, 谷少华, 梁沛, 张雷, 高希武, 2020. 化学杀虫剂对草地贪夜蛾毒力的生物测定方法比较. 昆虫学报, 63(5): 590–596.]
- Ma FJ, Li YD, Gao XW, 2012. Sublethal effects of metaflumizone on the development and reproduction of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 428–433. [马凤娟, 李永丹, 高希武, 2012. 氟氟虫腚亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育和繁殖力的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 428–433.]
- Mao M, Jiang CX, Liu MG, Li Q, Yang QF, Wang HJ, 2017. Study on hemocytes classification of *Hermetia illucens* (L.) larvae. *Journal of Environmental Entomology*, 39(6): 1342–1349. [毛敏, 蒋春先, 柳明刚, 李庆, 杨群芳, 王海建, 2017. 黑水虻幼虫血细胞类型的研究. 环境昆虫学报, 39(6): 1342–1349.]
- Miao J, Du ZB, Wu YQ, Gong ZJ, Jiang YL, Duan Y, Li T, Lei CL, 2014. Sub-lethal effects of four neonicotinoid seed treatments on the demography and feeding behavior of the wheat aphid *Sitobion avenae*. *Pest Management Science*, 70(1): 55–59.
- Ni RY, Meng Q, Zhang H, Zhang JH, Qin QL, 2018. Types, morphology and cellular immune functions of hemocytes in larvae of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(4): 432–438. [倪若尧, 孟茜, 张寰, 张继红, 秦启联, 2018. 小金蝠蛾幼虫血细胞的种类、形态及细

- 胞免疫功能. 昆虫学报, 61(4): 432–438]
- Okazaki T, Okudaira N, Iwabuchi K, Fugo H, Nagai T, 2006. Apoptosis and adhesion of hemocytes during molting stage of silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science*, 23(3): 299–304.
- Sato R, 2023. Mechanisms and roles of the first stage of nodule formation in lepidopteran insects. *Journal of Insect Science*, 23(4): 3.
- Satyavathi VV, Minz A, Nagaraju J, 2014. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling*, 26(8): 1753–1763.
- Selby TP, Lahm GP, Stevenson TM, 2017. A retrospective look at anthranilic diamide insecticides: Discovery and lead optimization to chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *Pest Management Science*, 73(4): 658–665.
- Shen J, Lu YH, Zhang SZ, You H, Li JH, 2016. Effects of sublethal concentrations of metaflumizone on detoxifying enzyme activity, and expression of cytochrome P450 genes, in *Plutella xylostella* (L.). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(2): 256–263. [申君, 鲁艳辉, 张淑真, 游红, 李建洪, 2016. 亚致死浓度氯氟虫脲对小菜蛾三种解毒酶及P450 mRNA表达量的影响. 应用昆虫学报, 53(2): 256–263.]
- Shi XB, Jiang LL, Wang HY, Qiao K, Wang D, Wang KY, 2011. Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pest Management Science*, 67(12): 1528–1533.
- Siddiqui MI, Al-Khalifa MS, 2014. Review of haemocyte count, response to chemicals, phagocytosis, encapsulation and metamorphosis in insects. *Italian Journal of Zoology*, 81(1): 2–15.
- Stanley D, Haas E, Kim Y, 2023. Beyond cellular immunity: On the biological significance of insect hemocytes. *Cells*, 12(4): 599.
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki N, Yoshiyama M, Kaneko Y, Iwasaki T, Sunagawa T, Yamaji K, Asaoka A, Mita K, Yamakawa M, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1087–1110.
- 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. [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.]
- Tu YG, Wu KM, Xue FS, Lu YH, 2010. Laboratory evaluation of flight activity of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*, 17(1): 53–59.
- Un-Nisa E, Ahmad M, Sheikh UAA, Imran M, Parveen N, Rahim J, 2023. Lethal and sublethal effects of flubendiamide and spirotetramat against the leaf worm, *Spodoptera litura* (Fabricius) under laboratory conditions. *PeerJ*, 11: e15745.
- Wrońska AK, Boguś MI, 2019. Harman and norharman, metabolites of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales), affect the serotonin levels and phagocytic activity of hemocytes, insect immunocompetent cells, in *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Cell and Bioscience*, 9(1): 29.
- Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi YH, 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell*, 48(4): 297–304.
- Wu S, Lin EJ, 2009. Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune responses in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 52(7): 791–798. [吴珊, 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.]
- Wu SF, Wang F, Huang J, Fang Q, Shen ZC, Ye GY, 2013. Molecular and cellular analyses of a ryanodine receptor from hemocytes of *Pieris rapae*. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(1): 1–10.
- Xia Q, Sun HX, Liu HY, 2014. Effects of nickel exposure on encapsulation rate of hemocytes of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. *Journal of Environmental Entomology*, 36(5): 718–723. [夏婧, 孙虹霞, 刘宏宇, 2014. Ni胁迫对斜纹夜蛾幼虫包裹反应的影响. 环境昆虫学报, 36(5): 718–723.]
- Xu ZS, Xue Y, Zhang L, Wang ZD, Zeng ZY, Yang MF, Zou X, 2020. Screening of *Isaria* isolates for controlling the pupae and second-instar larvae of *Spodoptera litura*. *Plant Protection*, 46(5): 93–101. [许忠顺, 薛原, 张丽, 王真娣, 曾召英, 杨茂发, 邹晓, 2020. 防治斜纹夜蛾蛹和2龄幼虫的棒束孢菌株筛选. 植物保护, 46(5): 93–101.]
- Yamamura T, Takahashi S, Satoh T, Iwabuchi K, Okazaki T, 2011. Regulatory mechanism of silkworm hemocyte adhesion to organs. *Zoological Science*, 28(6): 420–429.
- Zhang Z, Peng LS, Li K, Qian K, Xiang D, He L, 2021. Identification and pathway analysis of genes related to binge eating in taro caterpillar *Spodoptera litura* 4th instar larvae. *Journal of Plant Protection*, 48(6): 1281–1290. [张赞, 彭莉舒, 李坤, 钱坤, 相栋, 何林, 2021. 斜纹夜蛾四龄幼虫暴食相关基因的鉴定和通路分析. 植物保护学报, 48(6): 1281–1290.]
- Zhu Q, He Y, Yao J, Liu YZ, Tao LM, Huang QC, 2012. Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Science*, 12(27): 27.