

幼虫密度对斜纹夜蛾抗病能力的影响^{*}

孔海龙¹ 吕 敏² 祝树德^{1**}

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院 扬州 225009; 2. 江苏里下河地区农科所 扬州 225009)

摘 要 为了阐明斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 幼虫密度对其抗病能力的影响,在室内条件下(温度 23℃ ± 1℃,相对湿度 75%)对不同幼虫密度(1、2、5、10、15 头/皿(直径为 12 cm))饲养的斜纹夜蛾幼虫抵抗斜纹夜蛾核型多角体病毒侵染的能力及其免疫指标进行了研究。结果表明:幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫接种核型多角体病毒后的存活率、存活时间及血淋巴酚氧化酶活性影响显著。随着幼虫密度的增加,接种核型多角体病毒后幼虫的存活率降低,存活时间缩短。当幼虫密度达到 15 头/皿时,幼虫存活率显著低于其它幼虫密度。不同幼虫密度幼虫的存活时间以 1 头/皿的最高,15 头/皿的最低,且二者之间差异显著。幼虫血淋巴中酚氧化酶活性随幼虫密度的增加而明显降低,当幼虫密度达到 5 头/皿时,幼虫酚氧化酶活性显著低于 1 头/皿的。另外,幼虫溶菌酶活性和血细胞总数受幼虫密度影响不显著。不同密度幼虫抗病性的变化与其血淋巴中酚氧化酶活性的变化趋势较为一致。所以斜纹夜蛾幼虫抗病能力的降低可能与幼虫酚氧化酶活性的下降有关。因此,幼虫密度是影响斜纹夜蛾幼虫抗病性变化的重要因子。

关键词 斜纹夜蛾, 核型多角体病毒, 幼虫密度, 抗病能力, 免疫指标

Effects of larval density on disease resistance in the common cutworm, *Spodoptera litura*

KONG Hai-Long¹ LV Min² ZHU Shu-De^{1**}

(1. College of Plant Protection and Horticulture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Agricultural Institute of Lixiahe Area, Yangzhou 225009, China)

Abstract To investigate the effects of larval density on disease resistance in the common cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius, resistance to *S. litura* nuclear polyhedrosis virus (SLNPV) and immune parameters of larvae at densities of 1, 2, 5, 10 and 15 larvae per dish were tested in a laboratory. The results show that survival rate and survival time of larvae infected by SLNPV, and the activity of phenoloxidase in larval haemolymph, were significantly affected by larval density. The survival rate and survival time of larvae infected by SLNPV declined with increasing larval density. The survival rate of larvae at a density of 15 larvae per dish was significantly lower than that of larvae at a density of 1 larva per dish. The survival time of larvae was highest at a density of 1 larva per dish, and this was obviously higher than that at a density of 15 larvae per dish. Phenoloxidase activity in larval haemolymph significantly declined with increasing larval density. Phenoloxidase activity was significantly lower at larval densities of 5 larvae per dish, and higher at a density of 1 larva per dish. In addition, larval density had no significant effect on lysozyme activity and total haemocyte counts in the haemolymph. The trend in disease resistance with increasing larval density was consistent with the trend in phenoloxidase activity. Therefore, decreased resistance to disease may be due to reduced phenoloxidase activity. Thus, larval density is an important factor with regard to disease resistance in *S. litura* larvae.

Key words *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, larval density, disease resistance, immune index

病原物是调节昆虫种群数量的重要因子之一。一般来说,随着种群密度增加,昆虫被病原物

侵染的几率会增加,同时种群内个体对病原物的抗病能力也会改变,不同密度种群抗病能力的变

^{*} 资助项目:国家自然科学基金青年基金项目(31201503)、扬州大学引进人才科研启动费(0274983015508)。

^{**}通讯作者, E-mail: sdzhu@yzu.edu.cn

收稿日期:2012-08-17,接受日期:2012-08-26

化必将会影响整个种群数量的变动 (Anderson and May, 1981; Reilly and Hajek, 2008; Reynolds *et al.*, 2011)。对于年度间种群密度波动较大的害虫种类, 研究不同种群密度害虫对病原物抵抗能力的变化, 将为从害虫抗病性角度来探索其种群数量动态提供理论依据, 同时也为利用病原物防治害虫提供技术指导。

到目前为止, 关于昆虫种群密度与其抗病能力的关系已形成 4 种假说。(1) 高密度压力下, 昆虫的免疫功能减弱, 因此其对病原物的抵抗能力下降。Steinhaus (1958) 通过测定一种粉蝶 *Colias philodice* 和鹿眼蛱蝶 *Junonia coenia* 对病原物的抵抗能力证实了这种假说。(2) 与低密度种群相比, 高密度种群个体更易遭受病原物的侵染, 因此高密度种群个体能够分配较多的能量抵抗病原物的侵染以提高其抗病能力 (Kunimi and Yamada, 1990; Goulson and Cory, 1995; Reeson *et al.*, 1998; Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2009), 即密度依赖的抗病性 (DDP) (Wilson and Reeson, 1998)。(3) 某些昆虫种类在一定的密度范围内, 其抗病能力随密度的增加而提高, 但密度过高时, 昆虫的抗病能力又会下降。如 Goulson 和 Cory (1995) 研究了甘蓝夜蛾对核型多角体病毒的抵抗能力结果表明, 随着幼虫密度的增加, 甘蓝夜蛾幼虫的抗病能力先升高后降低。(4) 在某些种类中, 昆虫种群密度与其抗病能力无关 (Pie *et al.*, 2005)。因此, 种群密度对昆虫抗病能力的变化因种类不同而存在差异。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 是一种世界性分布的间歇性暴害虫 (祝树德等, 2000)。Tojo (1991) 研究发现, 斜纹夜蛾幼虫密度对其体色、发育、活跃程度等型变特征均有影响。但斜纹夜蛾幼虫密度是否会影响其抗病能力的变化并不清楚。自然条件下斜纹夜蛾被许多病原物寄生, 比如病毒、真菌、细菌及微孢子虫等, 其中斜纹夜蛾核型多角体病毒是调节斜纹夜蛾种群密度的重要因子 (蒋杰贤等, 1999; 谢建军等, 1999)。但是在斜纹夜蛾种群密度变化过程中, 不同密度种群本身对病毒的抵抗能力是否会有变化并不清楚。本文以斜纹夜蛾及其核型多角体病毒为研究对象, 系统研究了不同密度斜纹夜蛾幼虫对斜纹夜蛾核型多角体病毒抗病能力的变化规律。

1 材料与方法

1.1 虫源及幼虫密度设置

斜纹夜蛾虫源为中国科学院动物研究所昆虫病毒学研究组提供的幼虫, 经室内繁殖 1 代。实验共设 1、2、5、10、15 头/皿 (直径为 12 cm) 5 种密度处理, 处理从幼虫孵化后 (12 h) 开始, 且整个幼虫期保持皿内幼虫密度恒定。幼虫在人工气候箱内饲养, 温度为 $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $70\% \pm 5\%$, 光周期为 L:D = 14:10。幼虫饲以人工饲料, 饲养配方具体参见朱丽梅等 (2001), 幼虫 3 龄之前每 2 d 更换一次饲料并清理虫粪, 进入 4 龄之后, 每天更换饲料, 整个幼虫期保持饲料充足。

1.2 斜纹夜蛾幼虫对核型多角体病毒抵抗能力的测定

1.2.1 斜纹夜蛾核型多角体病毒悬浮液的配制

斜纹夜蛾核型多角体病毒由中国科学院动物研究所昆虫病毒学研究室惠赠。将病毒悬浮液母液用无菌水稀释若干倍后, 用血球计数板在显微镜下计数多角体含量, 配制成浓度为 1.0×10^7 个/mL 的病毒悬浮液。预实验结果表明, 该浓度下的斜纹夜蛾核型多角体病毒处理 5 龄幼虫的存活率约为 40% ~ 50%。

1.2.2 斜纹夜蛾幼虫对核型多角体病毒的抵抗能力

分别将不同密度饲养的 5 龄第 2 天的斜纹夜蛾幼虫单独隔离放入一次性塑料杯内, 饥饿 12 h 后, 接入含有 1 μL 斜纹夜蛾核型多角体病毒悬浮液的 1 mm^3 的人工饲料, 12 h 后选取取食完毒饲料的幼虫, 再饲以不含病毒的饲料, 饲养环境条件同 1.1。每天定时清理虫粪, 并观察因感染病毒死亡的幼虫数, 直到所有存活幼虫化蛹, 分别记录每个密度存活幼虫的个体数。实验中每个密度处理设 3 个重复, 每个重复 20 头幼虫, 同时每个密度设对照 3 个重复。

1.3 斜纹夜蛾幼虫血淋巴免疫指标的测定

1.3.1 幼虫血淋巴的制备 选取不同幼虫密度饲养的 5 龄第 2 天的斜纹夜蛾幼虫冰浴中提取血淋巴。具体操作如下: 用酒精棉球轻轻擦拭幼虫虫体, 昆虫针刺破虫体腹足, 将血淋巴收集于离心管内。每个密度处理中随机选取的 5 头幼虫总血淋巴为一重复, 每个处理设重复 3 个。

1.3.2 酚氧化酶活性的测定 参照冯从经等

(2004) 酚氧化酶活性的测定方法, 以 L-多巴胺为底物, 采用 1 350 μL 的反应体系, 750 μL 0.1 mol/L L-多巴胺, 100 μL 稀释的血淋巴酶液, 500 μL 磷酸缓冲液 (pH = 9.6) 混合均匀。在 22℃ 下于 492 nm 波长处, 用时间驱动程序自动监测其吸光值在 3 min 内的变化, 并记录反应速度。在上述条件下, 吸光值每分钟增加 0.001 所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (1U) (赵娇等, 1997)。蛋白含量的测定方法参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 染色法。以牛血清白蛋白作为测定的标准蛋白。

1.3.3 血细胞的计数 将 5 μL 血淋巴滴入血球计数板内, 静置 2~3 min, 在显微镜下计数。血细胞数目以每毫升血淋巴中血细胞的总数来表示。

1.3.4 溶菌酶活力的测定 参照 Wilson 等 (2002) 溶菌酶活力测定的抑菌圈法。供试菌种为溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 购自 Sigma 公司。根据配方 (1 g 琼脂, 500 mg 溶壁微球菌菌粉, 10 mg 链霉素, 100 mL 67 mmol/L pH 6.4 的磷酸钾缓冲液) 制作含有溶壁微球菌的培养基, 倒入直径 7.5 cm 培养皿内制成平板。在培养基中央打孔, 小孔直径为 2 mm, 滴入 2 滴 75% 的酒精, 待酒精挥发后加入 1 μL 不同密度处理的幼虫血淋巴。每个处理 3 个重复。将培养皿放入 30℃ 培养箱内, 24 h 后, 对平板上形成的抑菌圈进行拍照, 用 IMAGE PRO PLUS (6.0) 软件测量抑菌圈的直径大小。以不同浓度的鸡血清标准品的抑菌圈直径大小为 X 轴, 标准血清浓度的对数为 Y 轴制作标准曲线, 计算出不同密度幼虫血淋巴中抗菌物质的含量。

1.4 数据处理

所得数据用平均值 $\pm$ 标准误来表示。不同密度处理数据先进行方差分析, 再用 Duncan 多重比较法对处理间的差异进行显著性分析, 统计软件为 SPSS 11.0 版。

2 结果与分析

2.1 幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫抵抗核型多角体病毒能力的影响

5 个密度处理中对照组幼虫存活率均为 100%。不同密度斜纹夜蛾幼虫接种核型多角体病毒后幼虫存活率的测定结果 (图 1) 表明, 幼虫

密度对斜纹夜蛾幼虫的存活率影响显著 ($P < 0.05$)。随着幼虫密度的增加, 感染核型多角体病毒后的幼虫存活率明显下降。1、2、5、10、15 头/皿的幼虫存活率分别为 37.33%、32.38%、20.38%、18.67%、13.33%, 且 1 头/皿与 15 头/皿幼虫存活率差异显著 ($P < 0.05$), 而其它密度处理间差异不显著。

幼虫密度对幼虫接种病毒后的存活时间影响显著 (图 2)。不同幼虫密度饲养的幼虫接种病毒后的存活时间与存活率的变化趋势相同, 1、2、5、10、15 头/皿的幼虫存活时间分别为 7.17、7.09、6.88、5.91、5.39 d, 且 1 头/皿与 10、15 头/皿处理之间存在显著差异。

因此, 从幼虫接种病毒后的存活率和存活时间均可以看出, 随着幼虫密度的增加, 斜纹夜蛾幼虫对核型多角体病毒的抵抗能力逐渐下降。

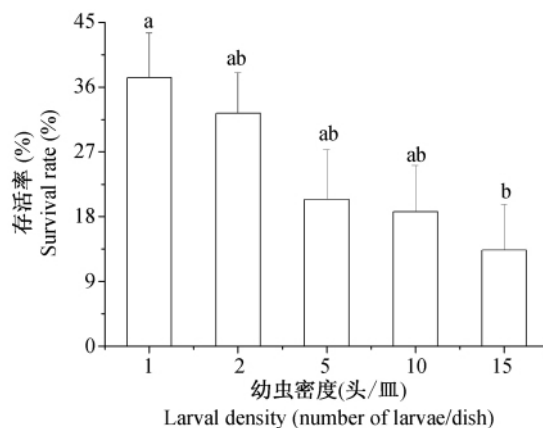


图 1 幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后存活率的影响

Fig. 1 Effect of larval density on the survival rate of *Spodoptera litura* larvae infected by SLNPV

注: 柱上标有不同字母表示经 Duncan 多重比较法检验差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

2.2 幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫血淋巴免疫指标的影响

幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫酚氧化酶活性的影响显著 (表 1)。随着幼虫密度的增加, 幼虫血淋巴酚氧化酶活性显著降低。以 1 头/皿的幼虫酚氧化酶活性最高, 显著高于 5、10、15 头/皿的

表 1 幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫血淋巴免疫指标的影响

Table 1 Effect of larval density on the immune indexes in haemolymph of *Spodoptera litura* larvae

幼虫密度 (头/皿)	血淋巴免疫指标		
	Immune indexes of haemolymph		
	酚氧化酶活性 (U/mg)	溶菌酶活力	血细胞总数 (10 ⁷ /mL)
Larval density (number of larvae/dish)	Phenoloxidase activity	(log µg lysozyme/mL haemolymph) Antibacterial activity	Total haemocyte counts
1	1.70 ± 0.22a	1.10 ± 0.13a	10.67 ± 1.92a
2	1.07 ± 0.09ab	1.04 ± 0.05a	8.80 ± 1.22a
5	0.84 ± 0.47b	1.10 ± 0.01a	9.60 ± 0.92a
10	0.46 ± 0.03b	0.99 ± 0.05a	10.4 ± 2.12a
15	0.35 ± 0.07b	1.09 ± 0.04a	8.00 ± 1.22a

注:表中所列数据为平均值 ± 标准误,同一列数据后标有不同字母为 Duncan 多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。
Data are presented as mean ± SE, and followed by different letters in the same column indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

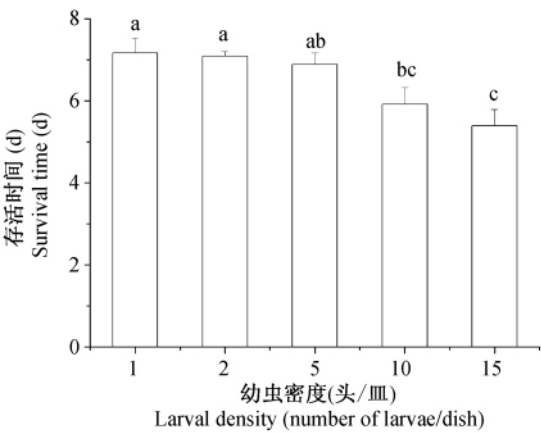


图 2 幼虫密度对斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后存活时间的影响

Fig.2 Effect of larval density on the survival time of *Spodoptera litura* larvae infected by SLNPV

($P < 0.05$),而与 2 头/皿幼虫的酚氧化酶活性差异不显著($P > 0.05$)。幼虫血淋巴溶菌酶活力和血细胞总数受幼虫密度影响并不显著(表 2)。

3 讨论

作者的实验结果表明,随着幼虫密度增加,斜纹夜蛾幼虫的抗病能力下降。该结果与假说(1)较一致。从不同密度斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后的存活率可以看出,在一定的幼虫密度范围内,随着幼虫密度的增加,接种核型多角体病毒后的幼虫存活率变化不明显,而幼虫密度过高时,幼虫的存活率明显降低。这些结果与 Reilly

和 Hajek (2008) 对舞毒蛾不同密度幼虫抵抗核型多角体病毒能力变化趋势的研究结果相似。Steinhaus (1958) 研究了粉蝶和鹿眼蛱蝶对病原物的抵抗能力也得出类似的结论。但是,这与其他鳞翅目昆虫幼虫密度引起的抗病能力反应并不一致。比如在非洲粘虫和东方粘虫密度依赖的抗病能力研究中发现,它们抗病能力的变化规律种假说(2)相一致 (Reeson *et al.*, 1998; Kunimi and Yamada, 1990)。另外,甘蓝夜蛾密度依赖的抗病能力的变化规律与假说(3)相符合 (Goulson and Cory, 1995)。不同种类昆虫密度引起的抗病能力的变化可能是其种群与病原物长期的互动而形成的一种适应性策略。

密度引起昆虫的抗病能力变化的现象已被大多数学者所接受,同时对于与其抗病能力相关生理因子——免疫功能的变化也被大家所认同 (Reeson *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2004; Srygley, 2012)。酚氧化酶是昆虫免疫系统的重要组成部分,它能参与昆虫密度引起的免疫防御反应。如:在非洲粘虫中,抗病能力强的高密度种群幼虫的血淋巴酚氧化酶的活性比低密度种群显著较高 (Reeson *et al.*, 1998)。对海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 的研究结果也表明,与低密度幼虫相比,高密度幼虫抗病能力较高,而且其幼虫血淋巴酚氧化酶活性升高,包裹反应增强,但血淋巴溶菌酶活力减弱 (Wilson *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2004)。作者对斜纹夜蛾不同幼虫密度下幼虫的

酚氧化酶的研究结果表明:随着幼虫密度的增加,幼虫的抗病能力逐渐减弱,幼虫的血淋巴酚氧化酶活性也降低。因此,斜纹夜蛾高密度幼虫抗病能力下降可能与幼虫血淋巴酚氧化酶活性的降低有关。高密度条件下,幼虫酚氧化酶活性的下降可能是斜纹夜蛾幼虫在种群密度压力下,为了防止种群数量持续增长造成病原物的流行而采取的一种降低种群自身的免疫能力的防御策略。

Reilly 和 Hajek (2008) 通过建立数学模型研究了舞毒蛾幼虫密度与抗病能力的关系结果表明,高密度种群抗病能力下降是种群稳定的重要机制。斜纹夜蛾核型多角体病毒是影响斜纹夜蛾种群密度变化的重要因子。核型多角体病毒在斜纹夜蛾种群中较易形成流行,在病毒流行过程中,不同密度幼虫抗病能力的变化将会影响幼虫与病原物的互动,进而影响整个种群的数量变化。高密度条件下,斜纹夜蛾幼虫抗病能力的下降可能是其种群维持稳定而采取的一种适应性策略。

参考文献 (References)

- Anderson RM, May RM, 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 291 (1054): 451—524.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248—254.
- Cotter SC, Kruuk LEB, Wilson K, 2004. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. *J. Evol. Biol.*, 17: 421—429.
- Goulson D, Cory JS, 1995. Responses of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) to crowding-interactions with disease resistance, color phase and growth. *Oecologia*, 104: 416—423.
- Kunimi Y, Yamada E, 1990. Relationship of larval phase and susceptibility of the armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus and a granulovirus. *Appl. Ent. Zool.*, 25: 289—297.
- Pie MR, Rosengaus RB, Calleri DV, Traniello JFA, 2005. Density and disease resistance in group-living insects: do eusocial species exhibit density-dependent prophylaxis? *Ethol. Ecol. Evol.*, 17: 41—50.
- Reeson AF, Wilson K, Gunn A, Hails RS, Goulson D, 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 265: 1787—1791.
- Reilly JR, Hajek AE, 2008. Density-dependent resistance of the gypsy moth *Lymantria dispar* to its nucleopolyhedrovirus, and the consequences for population dynamics. *Oecologia*, 154: 691—701.
- Reynolds JJ, White A, Sherratt JA, Boots M, 2011. The population dynamical consequences of density-dependent prophylaxis. *J. Theor. Biol.*, 288: 1—8.
- Ruiz-Gonzalez MX, Moret Y and Brown MJF, 2009. Rapid induction of immune density-dependent prophylaxis in adult social insects. *Biol. Lett.*, 5: 781—783.
- Srygley RB, 2012. Age- and density-dependent prophylaxis in the migratory, cannibalistic mormon cricket *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Environ. Entomol.*, 41 (1): 166—171.
- Steinhaus EA, 1958. Crowding as a possible stress factor in insect disease. *Ecology*, 39: 503—514.
- Tojo S, 1991. Variation in phase polymorphism in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Ent. Zool.*, 26 (4): 571—578.
- Wilson K, Cotter SC, Reeson AF, Pell JK, 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.*, 4: 637—649.
- Wilson K, Reeson AF, 1998. Density-dependent prophylaxis: Evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions? *Ecol. Entomol.*, 23: 100—101.
- Wilson K, Thomas MB, Blanford S, Dogget M, Simpson SJ, Moore SL, 2002. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *PNAS*, 99 (8): 5471—5475.
- 冯从经, 邱鸿贵, 邱中良, 符文俊, 2004. 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. *昆虫学报*, 47 (3): 298—304.
- 蒋杰贤, 梁广文, 庞雄飞, 1999. 斜纹夜蛾天敌作用的评价. *应用生态学报*, 10 (4): 461—463.
- 谢建军, 胡美英, 许再福, 1999. 斜纹夜蛾的天敌及其生物防治. *昆虫天敌*, 21 (2): 82—92.
- 赵娇, 戚晓玉, 尤瑜敏, 王季襄, 周培根, 1997. 日本对虾的酚氧化酶特性研究. *上海水产大学学报*, 6 (3): 157—165.
- 朱丽梅, 倪钰萍, 曹晓宇, 黄春霞, 崔勤, 2001. 斜纹夜蛾的人工饲养技术. *昆虫知识*, 38 (3): 227—228.
- 祝树德, 陆自强, 陈丽芳, 郁伟, 张绍军, 2000. 温度和食料对斜纹夜蛾种群的影响. *应用生态学报*, 11 (1): 111—114.