幼虫密度对粘虫抵抗苏云金芽孢杆菌和球孢白僵菌侵染能力的影响*

孔海龙** 袁 琳 董传磊 郑敏圆 荆王辉 田 振 侯秋莉

（扬州大学园艺与植物保护学院，扬州 225009）

摘 要 **【目的】** 明确粘虫 *Mythimna separata* 幼虫不同密度下抗病能力的变化规律。**【方法】** 在室内条件下，采用叶片药膜法与浸虫法，对不同密度（1、2、5、10、30 头/瓶（650 mL））饲养的粘虫幼虫抵抗苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*，Bt）和球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）侵染的能力进行研究。**【结果】** 不同粘虫幼虫密度对接种苏云金芽孢杆菌及球孢白僵菌后幼虫的存活率和存活时间影响显著。随着幼虫密度的增加，苏云金芽胞杆菌侵染的幼虫存活率明显升高、存活时间显著延长，幼虫存活率以 10 头/瓶的最高，显著高于 1 头/瓶和 2 头/瓶的；幼虫存活时间以 30 头/瓶的最长，明显长于 1 头/瓶、2 头/瓶、5 头/瓶的。同时，随着幼虫密度的升高，球孢白僵菌与苏云金芽孢杆菌侵染的幼虫存活率、存活时间变化趋势相同，高密度幼虫的存活率和存活时间均显著高于低密度的幼虫。**【结论】** 幼虫密度是影响粘虫幼虫抗病性变化的重要因子，且高密度幼虫的抗病能力明显高于低密度幼虫。

关键词 粘虫；苏云金芽孢杆菌；球孢白僵菌；幼虫密度；抗病能力

Effects of larval density on resistance of *Mythimna separata* larvae to *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana*

KONG Hai-Long** YUAN Lin DONG Chuan-Lei ZHENG Min-Yuan
JING Wang-Hui TIAN Zhen HOU Qiu-Li

(College of Plant Protection and Horticulture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract **[Objectives]** To clarify the dynamics of disease resistance in *Mythimna separata* larvae reared at different larval densities. **[Methods]** The resistance of larvae to *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Beauveria bassiana* at densities of 1, 2, 5, 10 and 30 larvae per jar were tested by the membrane method and the immersion method in a laboratory. **[Results]** Larval density had significant effects on the survival rate and survival time of larvae infected with Bt and *B. bassiana*. At higher larval densities the survival rate and survival time of larvae infected with Bt significantly increased. The survival rate was highest at a density of 10 larvae per jar, which was significantly higher than that at densities of 1 and 2 larvae per jar. The larval survival time was longest at a density of 30 larvae per jar, which was significantly longer than that at 1, 2 and 5 larvae per jar. The trend in survival rate and survival time of larvae infected with Bt at different densities was consistent with that of larvae infected with *B. bassiana*. The survival rate and survival time of larvae at high densities were significantly higher than that of larvae at low densities. **[Conclusion]** Larval density has an important effect on disease resistance in *M. separata*; larvae have significantly greater resistance at higher than at lower densities.

Key words *Mythimna separata*; *Bacillus thuringiensis*; *Beauveria bassiana*; larval density; disease resistance

昆虫被病原物侵染是一种普遍现象。一般情况下，随着种群密度的增加，昆虫被病原物侵染的风险明显增大（Anderson and May，1981）。但是，近年来科学家研究发现，与低密度种群相

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31672018）；国家重点研发计划（2018YFD0201400；2018YFD0201200）

**第一作者 First author，E-mail：khl2504@126.com

收稿日期 Received：2019-08-19；接受日期 Accepted：2019-11-23

比，高密度种群对病原物的抵抗力显著增强，这是由于昆虫将种群密度增加作为感染病原物的一种信号，高密度种群个体发育中能够分配较多的能量用于抵抗病原物的侵染，这种现象被称为昆虫密度依赖的抗病性（Density-dependent prophalaxis，DDP）（Reeson *et al.*，1998；Kunimi and Yamada，2008）。高密度、低密度种群对病原物抵抗能力的变化，将导致整个种群数量的波动（Reilly and Hajek, 2008）。因此，研究不同种群密度害虫抗病能力的变化，将为从害虫抗病能力的变化角度来探索其种群数量动态提供理论依据，同时也为害虫的生物防治提供技术指导。

昆虫密度依赖的抗病性现象已在鳞翅目、直翅目等具“型变”特征的昆虫种类中得到了证实（Reeson *et al.*，1998；Wilson *et al.*，2002）。例如高密度条件饲养的非洲粘虫 *Spodoptera exempta* 幼虫接种核型多角体病毒后的死亡率为42%，而单头饲养的非洲粘虫幼虫的死亡率则高达 70%，同时高密度的非洲粘虫幼虫 LD_{50} 是低密度的 10 多倍（Reeson *et al.*，1998）。Kong 等（2013）研究发现，接种球孢白僵菌和伞裙追寄蝇 *Exorista civilis* 寄生后，高密度条件下饲养的（10 头/瓶和 30 头/瓶）草地螟 *Loxostege sticticalis* 幼虫的存活率显著高于低密度条件下饲养（1 头/瓶）的幼虫。Wilson 和 Graham（2015）研究发现以 6 头/瓶的密度饲养的海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 幼虫接种不同浓度的海灰翅夜蛾核型多角体病毒后的存活率显著地高于 1 头/瓶的密度饲养下的幼虫。Wilson 等（2002）在对具有典型“型变”特征的直翅目沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的研究发现，群居型蝗虫（高密度）对于绿僵菌的抵抗力显著地高于散居型的蝗虫（低密度）。同时，在少数不具“型变”特征的社会性昆虫中也发现存在密度依赖的抗病性现象。例如：William 等（2002）对切叶蚁 *Zootermopsis angusticollis* 的研究发现，接种 1×10^7、1×10^6、1×10^5 个/mL 3 个浓度的绿僵菌后，单头饲养下的切叶蚁的死亡率都显著地高于多头饲养的，并且这种差异在接种 1×10^6 个/mL 浓度的绿僵菌后最为明显。Rosengaus 等（1998）对白蚁 *Zootermopsis angusticollis* 的研究发现，群居的若虫接种绿僵菌后，其存活率及存活天数都显著高于独居的。以上结果表明许多昆虫种类对不同病原微生物均存在昆虫密度依赖的抗病性现象。

粘虫 *Mythimna separate*（Walker）是一种季节性南北远距离迁飞性害虫，具有典型的“型变”特征（江幸福等，2014）。近年来，粘虫在我国东北、西北局部地区严重危害，在全国范围内呈现暴发成灾趋势，是严重威胁我国粮食生产安全的重大生物灾害（张云慧等，2013；江幸福等，2014）。幼虫密度高是粘虫大发生的重要特征之一。有关粘虫幼虫密度依赖的抗病性变化已有一些相关报道。Kunimi 和 Yamada（2008）研究还发现，高密度（20 头/瓶）饲养的粘虫幼虫对颗粒体病毒的抵抗能力约为单头饲养幼虫的 2 倍。事实上，自然条件下，导致粘虫感病死亡除了病毒外，还有真菌、细菌等（江幸福等，2014）。然而，高密度、低密度粘虫种群对细菌、真菌的抵抗能力是否会有变化并不清楚。为进一步弄清粘虫幼虫密度依赖的抗病性现象，本研究以粘虫、苏云金芽孢杆菌及球孢白僵菌为研究对象，设置 5 个不同密度梯度，系统研究了不同密度粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌及球孢白僵菌抗病能力的变化规律。

1 材料与方法

1.1 虫源与幼虫密度设置

粘虫虫源：中国农业科学院植物保护研究所迁飞害虫课题组提供虫卵，孵出的幼虫室内用玉米叶片饲养繁育 1 代，玉米品种为 958，由中国农业大学培育。试验共设 1、2、5、10 和 30 头/瓶 5 个幼虫密度。幼虫孵化后 24 h 内，移入装有玉米苗的玻璃瓶内（直径 6.5 cm，高 10.0 cm），尼伦纱布遮盖瓶口，2 龄之前每两日更换一次新鲜的玉米叶片，3 龄后每日更换一次，且整个幼虫期保持瓶内幼虫密度恒定、食物充足。幼虫在人工气候箱内饲养，温度为（23±1）℃，光周期

L：D=16：8，相对湿度为 70%-75%。

1.2　不同密度粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌抵抗能力的测定

采用叶片药膜法测定 Bt 制剂对粘虫幼虫的致死中浓度。称取 0.8 g 16 000 IU/mg 的苏云金芽孢杆菌（Bt）可湿性粉剂（扬州绿源生物化工有限公司），溶于 100 mL 含有 0.1%吐温-80 的无菌水中（128 IU/mg），按照等比稀释的方法配置 8、16、32、64、128 IU/mg 浓度的药液。剪取新鲜的玉米叶片，清洗干净后浸于上述配制的苏云金芽孢杆菌药液中 10 s，以 0.01%吐温-80 无菌水作对照，处理后的叶片于室温晾干后放入垫有湿润滤纸培养皿中，接入常规饲养的 4 龄粘虫幼虫，然后置于人工气候培养箱内正常饲养。每天记录各组幼虫死亡数，直到幼虫化蛹，计算死亡率。每个处理重复 4 次，每个重复 20 头幼虫。

根据上述结果所得Bt对幼虫的致死中浓度，测定不同密度粘虫幼虫对 Bt 制剂的抵抗能力。试虫为 1、2、5、10、30 头/瓶饲养的 4 龄粘虫幼虫，具体方法同上述的药膜法，计算各处理的存活率和存活时间，每个密度设 4 个重复，每重复接 20 头幼虫。

1.3　不同密度粘虫幼虫对球孢白僵菌抵抗能力的测定

采用浸虫法测定球孢白僵菌对粘虫幼虫的致死中浓度。本试验所用球孢白僵菌水分散粒剂来自于网购，首先用 0.01%吐温-80 无菌水稀释，通过血球计数板计数，配置孢子浓度为：10^5、10^6、10^7、10^8、10^9 个孢子/mL 的球孢白僵菌悬浮液。选取常规饲养的 4 龄粘虫幼虫分别浸于不同浓度的孢子悬浮液中，5 s 后取出，对照组浸于 0.01%吐温-80 无菌水，用滤纸吸取虫体上多余液体，放入玻璃管中，在人工气候培养箱中单独饲养。每天记录各处理的死亡虫数，直至幼虫化蛹，计算死亡率。每个处理重复 4 次，每个重复处理 20 头幼虫。

根据上述结果所得球孢白僵菌对幼虫的致死中浓度，测定不同密度粘虫幼虫对球孢白僵菌的抵抗能力。试虫为 1、2、5、10、30 头/瓶饲养的 4 龄粘虫幼虫，具体方法同上述的浸虫法，计算各处理的存活率和存活时间，每个密度处理设 4 个重复，每个重复 20 头幼虫。

1.4 数据处理

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析（ANOVA），Duncan 氏多重比较进行均值间差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　不同密度粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌的抵抗能力

由表 1 可以看出，苏云金芽孢杆菌可湿性粉剂对粘虫幼虫的致死中浓度为 45.29 U/mL。以该浓度苏云金芽孢杆菌侵染不同密度饲养的粘虫幼虫存活率的试验结果表明，幼虫密度对粘虫幼虫存活率有显著影响（P<0.05）。随着密度的增加，幼虫存活率显著升高，当密度达到 30 头/瓶时又略下降（图 1）。1、2、5、10、30 头/瓶的幼虫平均存活率分别为 35%、38%、45%、52%和 47%，其中 10 头/瓶的幼虫存活率最高，显著高于 1 头/瓶和 2 头/瓶的（P<0.05）；1 头/瓶的幼虫存活率最低，显著低于 10 头/瓶和 30 头/瓶的（P<0.05）；而 2、5 和 30 头/瓶之间无显著差异（P>0.05）。

表 1　苏云金芽孢杆菌可湿性粉剂对粘虫幼虫的毒力
Table 1　Toxicity of Bt against larvae of *Mythimna separata*

项目 Item	浓度 Concentration（U/mL）					
	0	8	16	32	64	128
死亡率（%） Mortality rate (%)	5	17.5	20	40	60	75
毒力回归方程 Regression equation	P=–2.47+1.49LgC				R^2=0.99	
LC_{50} (U/mL)	45.28					
95%置信区间 95% confidence limits	36.32-57.72					

幼虫密度对幼虫接种苏云金芽孢杆菌后的存活时间如图 2 所示。随着密度的增加，幼虫的存活时间显著延长，1、2、5、10、30 头/瓶的幼

虫存活时间分别平均为 2.70、3.50、5.05、5.95、6.00 d，且 1 头/瓶与其他幼虫密度处理之间存在显著差异（P<0.05）。

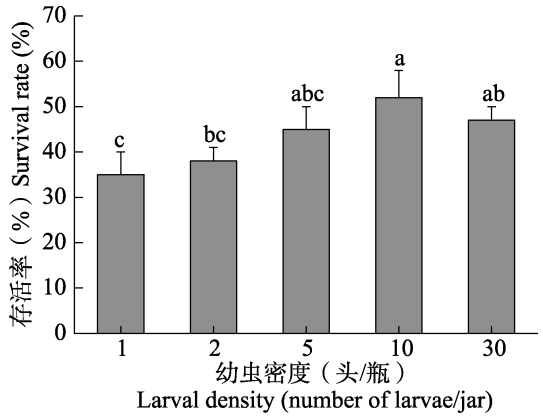

图 1　幼虫密度对粘虫幼虫接种苏云金芽孢杆菌后存活率的影响

Fig. 1　Effect of larval density on the survival rate of *Mythimna separata* larvae infected by *Bacillus thuringiensis*

柱上标示不同字母表示 Duncan 氏多重比较法检验差异显著(P<0.05)。下图同。
Histograms with different letters indicate significantly different at 0. 05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

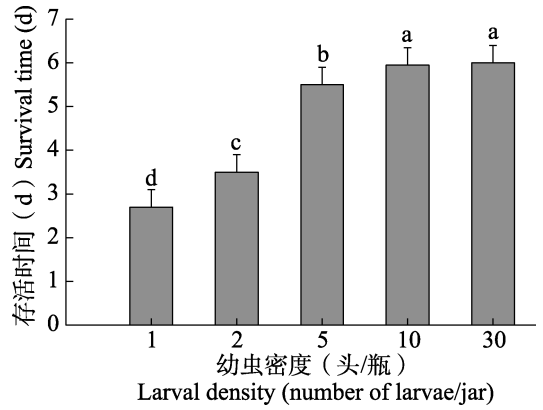

图 2　幼虫密度对粘虫幼虫感染苏云金芽孢杆菌后存活时间的影响

Fig. 2　Effect of larval density on the survival time of *Mythimna separata* larvae infected by *Bacillus thuringiensis*

因此，从幼虫接种苏云金芽孢杆菌后的存活率和存活时间均可以看出，随着幼虫密度的增加，粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌的抵抗能力逐渐上升，当达到一定密度时，幼虫对病原物的抵抗能力趋于稳定。

2.2　不同密度粘虫幼虫对球孢白僵菌的抵抗能力

由表 2 可以看出，球孢白僵菌水分散粒剂对粘虫幼虫的致死中浓度孢子数为 1.17×10^8 个/mL。该浓度的球孢白僵菌侵染不同密度饲养的粘虫幼虫后其存活率试验结果表明，幼虫密度对粘虫幼虫存活率具有显著影响（P<0.05）。随着密度的增加，幼虫存活率显著升高。1、2、5、10、30 头/瓶的幼虫平均存活率分别为 35%、39%、48%、50%和 55%。其中 30 头/瓶的幼虫存活率最高，显著高于 1、2、5 头/瓶的（P<0.05）；1 头/瓶的幼虫存活率最低，显著地低于 5、10、30 头/瓶的（P<0.05）；10 头/瓶和 30 头/瓶之间无显著差异（P>0.05）。

表 2　球孢白僵菌对粘虫幼虫的毒力

Table 2　Toxicity of *Beauveria bassiana* against larvae of *Mythimna separata*

项目 Item	孢子浓度（个/mL） Concentration (spore /mL)					
	0	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
死亡率（%） Mortality rate (%)	3.75	11.25	16.25	31.25	56.25	61.25
毒力回归方程 Regression equation	P=–3.367+0.417LgC　R^2=0.94					
LC_{50}（个/mL） (spore /mL)	1.17×10^8					
95%置信区间 95% confidence limits	5.35×10^7-3.25×10^8					

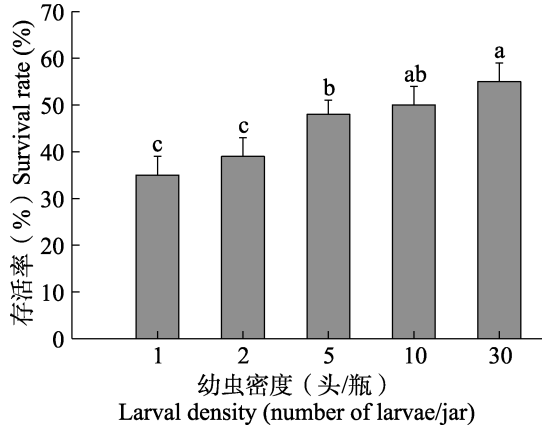

图 3　密度对粘虫幼虫感染球孢白僵菌后存活率的影响

Fig. 3　Effect of larval density on the survival rate of *Mythimna separata* larvae infected by *Beauveria assiana*

幼虫密度对幼虫接种球孢白僵菌后的存活时间如图 4 所示。随着密度的增加，幼虫的存活时间显著升高，1、2、5、10、30 头/瓶的幼虫平均存活时间分别为 4.45、4.90、4.65、6.00 和 6.70 d，且 30 头/瓶的幼虫存活时间显著高于其他密度的幼虫（P<0.05）。

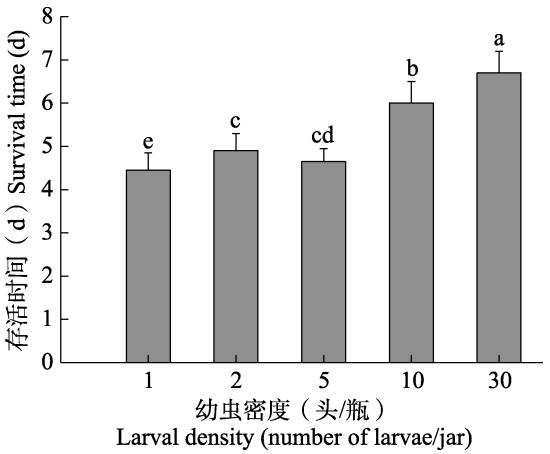

图 4　幼虫密度对粘虫幼虫感染球孢白僵菌后存活时间的影响

Fig. 4　Effect of larval density on the survival time of *Mythimna separata* larvae infected by *Beauveria bassiana*

因此，从幼虫被球孢白僵菌侵染后的存活率和存活时间均可以看出，当粘虫幼虫处于低密度情况下，幼虫对球孢白僵菌的抵抗能力较低，当达到一定密度时，幼虫对病原物的抵抗能力显著升高。

3　结论与讨论

已有研究结果表明，粘虫高密度幼虫对粘虫颗粒体病毒的抵抗能力显著高于低密度幼虫（Kunimi and Yamada，2008）。本实验结果表明，随着幼虫密度的增加，粘虫幼虫对苏云金芽孢杆菌的抵抗能力明显增强。从不同密度粘虫幼虫接种苏云金芽孢杆菌后的存活情况可以看出，在 1-10 头/瓶的密度范围内，随着幼虫密度的逐渐增加，幼虫的存活率显著升高。同时，幼虫的存活时间均明显延长。从粘虫幼虫接种球孢白僵菌后的存活情况也可以看出，在 1-30 头/瓶的密度范围内，随着幼虫密度的增加，幼虫的存活率和存活时间均明显升高。因此，在一定的密度范围内，高密度粘虫幼虫对病毒、细菌、真菌等病原物的抵抗能力均显著高于低密度幼虫。我们推测，粘虫对多种病原物的抵抗过程中，均存在幼虫密度依赖的抗病性现象。

研究中发现，30 头/瓶的粘虫幼虫接种苏云金芽孢杆菌后的存活率略低于 10 头/瓶，然而接种白僵菌后的幼虫存活率以 30 头/瓶显著高于 10 头/瓶。这可能与粘虫对不同种类病原菌的耐受能力及病原菌的致死作用机理有关（白雪峰, 2014；张琛等, 2020）。1 头/瓶的粘虫幼虫接种苏云金芽孢杆菌后的平均存活时间为 2.70 d，而相同密度接种球孢白僵菌的幼虫平均存活时间为 4.45 d。苏云金芽孢杆菌可通过产生杀虫晶体蛋白、α-外毒素、β-外毒素等物质直接作用于昆虫（常明等，2010），而球孢白僵菌需要通过体壁接触后感染发病作用于昆虫，所以后者存活时间较长。因此，粘虫幼虫密度依赖的抗病能力的强弱与其被侵染菌的种类可能也有一定关系。

幼虫密度依赖的抗病性在昆虫与其病原物互作过程中起重要作用（Anderson and May，1981）。Reilly 和 Hajek（2008） 通过建立数学模型研究昆虫幼虫密度与抗病能力的关系中认为，许多具有“型变”特征害虫的暴发与其密度依赖抗病性的关系密切相关。粘虫颗粒体病毒等病原物是影响粘虫种群动态变化的重要因子（江幸福等，2014）。自然条件下，细菌、真菌等病原微生物也可能在粘虫种群中流行发生，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作，进而影响整个种群的数量动态。高密度条件下，粘虫幼虫抗病能力的增强可能是粘虫种群暴发的重要影响因子（Kong *et al*., 2018）。

总之，本研究发现，粘虫在一定的幼虫密度范围内，幼虫对苏云金芽孢杆菌和球孢白僵菌的抵抗力显著增强。说明幼虫密度是影响粘虫抗病能力的重要因子。这对于从粘虫幼虫抗病能力变化角度来探索其种群数量动态变化具有重要理论意义，同时也为利用病原微生物防治粘虫提供技术指导。

参考文献 (References)

Anderson RM, May RM, 1981. The population dynamics of

microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 291(1054): 451–524.

Chang M, Sun QH, Zhou SG, Ni JR, 2010. Factors analysis and process selection for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Ecology and Environmnet*, 19(6): 1471–1477. [常明, 孙启宏, 周顺桂, 倪晋仁, 2010. 苏云金芽孢杆菌生物杀虫剂发酵生产的影响因素及其工艺选择. 生态环境学报, 19(6): 1471–1477.

Jiang XF, Zhang L, Chen YX, Luo LZ, 2014. Current status and trends in research on the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(4): 881–889. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫研究现状及发展趋势. 应用昆虫学报, 51(4): 881–889.]

Kong HL, Cheng YX, Luo LZ, Sappington TW, Jiang XF, Zhang L, 2013. Density-dependent prophylaxis in crowded beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae to a parasitoid and a fungal pathogen. *International Journal of Pest Management*, 59(3): 174–179.

Kong HL, Dong CL, Tian Z, Mao N, Wang C, Cheng YX, Zhang L, Jiang XF, Luo LZ, 2018. Altered immunity in crowded *Mythimna separata* is mediated by octopamine and dopamine. *Scientific Reports*, 8(1): e3215.

Kunimi Y, Yamada E, 2008. Relationship of larval phase and susceptibility of the armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera, Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus and a granulosis virus. *Applied Entomology and Zoology*, 25(2): 289–297.

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. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences*, 265 (1407): 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(4): 691–701.

Rosengaus AB, Maxmen LE, James C, Traniello FA, 1998. Disease resistance: A benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 44(2): 125–134.

William OH, Hughes JE, Boomsma JJ, 2002. Trade-offs in group living: Transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings Biological Sciences*, 269(1502): 1811–1819.

Wilson K, Cotter SC, Reeson AF, Pell JK, 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4(6): 637–649.

Wilson K, Graham RI, 2015. Transgenerational effects modulate density-dependent prophylactic resistance to viral infection in a lepidopteran pest. *Biology Letters*, 11(3): 1–4.

Wilson K, Thomas MB, Blanford S, Doggett M, Simpson SJ, Moore SL, 2002. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(8): 5471–5475.

Zhang YH, Zhang Z, Li C, Jiang YY, Zeng J, Cheng DF, 2013. Seasonal migratory behavior of *Mythimna separate* (Lepidoptera: Noctuidae) in northest China. *Acta Entomologica Sinica*, 56(12): 1418–1429. [张云慧, 张智, 李超, 姜玉英, 曾娟, 程登发, 2013. 东北地区粘虫的季节性迁飞行为. 昆虫学报, 56(12): 1418–1429.]

Bai XF, 2013. Isolation and screening of Bt strains against Noctuidae. *Biological Disaster Science*, 37(3): 241–243. [白雪峰, 2014. 夜蛾科昆虫高毒力苏云金杆菌菌株的分离和筛选. 生物灾害科学，37(3): 241–243.]

Zhang C, Chen SB, Wu CY, Zhang BY, Zhang Y, Teng B, Hu BJ, 2020. Screening of *Beauveria bassiana* Strains with high virulence against armyworm and activities of protective enzymes in the larvae infected by fungi. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 34(12): 2701–2707. [张琛, 陈思博, 吴晨源, 张步遥, 张瑛, 腾斌, 胡本进, 2020. 粘虫高毒力白僵菌菌株筛选及其感菌后虫体内保护酶活性的变化. 核农学报，34(12): 2701–2707.]