越冬滞育前后松阿扁叶蜂幼虫体壁防御体系的变化*

王海香** 陈 凡 师振萍 薛婉怡 孙亚星 高瑞贺 郭红彦***

（山西农业大学林学院，太谷 030801）

摘 要 **【目的】** 食叶害虫松阿扁叶蜂 *Acantholyda posticalis* Matsumura 以老熟幼虫在地下越冬，越冬期间体壁保护其不受外来物的侵害。研究松阿扁叶蜂幼虫体壁对生态的适应性，对于其管理和防治具有重要意义。**【方法】** 采用石油醚溶解脂肪、饱和 KOH 消化几丁质和考马斯亮蓝结合法测定松阿扁叶蜂不同龄期幼虫蛋白质质量和含量；采用 FB 28 和 HE 染色法研究幼虫体壁几丁质和脂肪发育的动态变化；采用紫外分光光度计比色法测定体壁多酚氧化酶的蛋白含量和活性变化。**【结果】**（1）松阿扁叶蜂幼虫体壁几丁质、总蛋白质、总脂肪含量均随着幼虫发育阶段的变化而增加：蛹前滞育>入土滞育>5 龄>4 龄，且在 5 龄至入土前迅速增长。（2）松阿扁叶蜂幼虫体壁的几丁质和脂肪厚度随幼虫发育阶段变化趋势为：入土滞育>蛹前滞育>5 龄>4 龄，且在 5 龄至入土前迅速增长。（3）随着幼虫发育，松阿扁叶蜂幼虫总脂肪含量变化平缓，几丁质含量呈现下降-升高-下降趋势，总蛋白质含量呈现升高-降低-升高趋势。（4）随着幼虫的发育，松阿扁叶蜂幼虫体壁多酚氧化酶含量呈现先升高后持续降低的趋势，而活力正好相反，变化波形趋势近似互补。**【结论】** 几丁质和蛋白质含量变化曲线相反，波形互补，多酚氧化酶的含量-活性变化互补，这两种互补在松阿扁叶蜂越冬滞育和非滞育期间又构成了互补的体壁防御体系。

关键词 松阿扁叶蜂；滞育；体壁防御；化学成分；多酚氧化酶

Diapause-induced changes in cuticle defense compounds in *Acantholyda posticalis* larvae

WANG Hai-Xiang** CHEN Fan SHI Zhen-Ping XUE Wan-Yi
SUN Ya-Xing GAO Rui-He Guo Hong-Yan***

(Forestry College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract **[Aim]** *Acantholyda posticalis* Matsumura is a defoliating insect. The cuticle of mature *A. posticalis* larva protects it from the external environment during overwintering. Understanding the ecological adaptability of the larval cuticle is essential for the integrated management of *A. posticalis*. **[Methods]** Variability in the quality and quantity of chitin, fats, and protein in the larval cuticle were investigated by dissolving fat in mineral ether, digesting chitin using saturated KOH, and detecting protein with Coomassie brilliant blue. Variation in the dynamic development of chitin and fats was investigated using Fluorescent Brightener 28 (FB28) and Hematoxylin-eosin staining (HE). Colorimetry was used to determine the protein content and activity of polyphenol oxidase (PPO on the integument. **[Results]** (1) The quality of chitin, total protein, and total fats in the cuticle gradually increased from prepupal diapause, through the soil diapause, the 5th instar and the 4th instar larva stages. There was a marked increase from the fifth instar to the point of entering the soil. (2) Chitin and fat thickness of the larval integument varied during development from soil diapause through to prepupal diapause, the 5th instar, and 4th instar stages. Thickness increased rapidly from the 5th instar stage to entering the soil. (3) There was minimal variation in total fat content, whereas chitin content showed a decreasing-increasing-decreasing trend. Total protein content also showed an

*资助项目 Supported projects：山西省青年基金（20210302124359）

**第一作者 First author，E-mail：whx25@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：ghybjh2004@163.com

收稿日期 Received：2023-02-07；接受日期 Accepted：2023-09-27

increasing-decreasing-increasing trend during larval development. (4) The variation in protein content and PPO activity showed a complementarity trend. As the larvae developed, the protein content of PPO in the larval integument initially increased, then showed a consistent decrease. In contrast, PPO activity displayed the opposite trend. **[Conclusion]** The variation in chitin and protein content of larval integument exhibited an opposing but complementary pattern. The fluctuations in protein content and PPO activity appeared to be complimentary. These two forms of complimentary variation collectively establish a balanced defense system in the larval integument during winter-diapause and non-diapause.

Key words　*Acantholyda posticalis* Matsumura; diapause; cuticle defense; chemical composition; polyphenol oxidase

昆虫体壁结构和化学成分的复杂性，使其适应所处的生态环境（Vincent and Wegst，2004；Vincent and Ring，2009）。几丁质、脂肪和蛋白质作为体壁重要的组成部分，不仅是体壁的重要保护物质（Katarzyna *et al.*，2018），而且在昆虫生长发育过程中发挥着重要作用。体壁表皮蛋白通过与几丁质的共价结合，提高表皮结构的稳定性（Neville，1975），脂类在昆虫表皮中不仅有保水作用（Wigglesworth，1975），还影响昆虫表皮的防御，起着屏障作用（Howard and Blomquist，2005）。在滞育过程中，昆虫脂肪体细胞超微结构会发生变化（Brown and Chippendale, 1978），可见体壁物质的变化能影响昆虫体壁结构。除几丁质、蛋白质、脂肪三大元素外，昆虫体壁内的多酚氧化酶（Polyphenol oxidase，PPO）参与体壁硬化、黑化（Theopold *et al.*，2004；Fujisawa and Okuno，2005）和伤口愈合（Hearing and Jiménez，1987；Andersen，2010），多酚氧化酶亦是昆虫重要的免疫蛋白酶，参与昆虫的变态发育和免疫防御，对昆虫抵御越冬等不良生态条件具有重大意义（Ashida and Yamazaki，1990；Boman *et al.*，1991）。

松阿扁叶蜂 *Acantholyda posticalis* Matsumura 主要危害油松 *Pinus tabuliformis* Carrière、赤松 *P. densiflora*、黑松 *P. thunbergii* 等（高锋等，2011），主要以幼虫危害，严重时树冠枝梢布满丝网，大部分针叶被咬断落地，造成树势衰弱甚至整株死亡。松阿扁叶蜂在世界范围广泛分布（Voolma *et al.*，2016），在我国主要分布于北方地区（李兵和刘艳玲，2014）。近年来松阿扁叶蜂在山西、陕西、山东、黑龙江等地危害日益加重。松叶蜂发生的特点是种群上升速度不清楚，突发性强，一般暴发会持续 2-4 年（萧刚柔和李镇宇，2020）。松阿扁叶蜂老熟幼虫滞育越冬越夏，滞育期间幼虫体壁是防御病原物侵染的第一道天然防线，了解松阿扁叶蜂越冬滞育前后体壁物质的变化，有助于理解幼虫体壁结构的变化，对于理解老熟幼虫种群平稳越冬，种群快速增长有一定的参考价值。国内外关于松阿扁叶蜂的生物学特性、滞育、抗寒等方面研究均未解释清楚种群突然快速增长的原因（梁中贵等，2005；张桂华，2008；高锋等，2011），本研究拟测定松阿扁叶蜂越冬滞育前后幼虫体壁主要成分的质量及含量、PPO 的含量及活性，以期探究松阿扁叶蜂幼虫体壁防御变化和生态适应性。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试松阿扁叶蜂采于山西省长治市壶关县，分别于 2020 年 4 月 24 日采集蛹前滞育幼虫；于 2020 年 6 月 11 日采集虫卵与松针，在山西农业大学森保实验室孵化及饲养，将 4 和 5 龄虫态用液氮速冻，－80 ℃保存待用；于 2021 年 1 月 1 日采集越冬入土滞育幼虫，同样进行液氮处理保存。4 龄幼虫属于非滞育期，5 龄老熟幼虫进入诱发滞育期，入土滞育为滞育维持期，蛹前滞育代表滞育终止末期，这 4 种发育阶段代表非滞育期到滞育期的变化阶段。

1.2　试虫体壁几丁质和脂肪厚度测定

选取各 10 头 4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫共计 40 头幼虫的新鲜组织置于 4%多聚甲醛固定液中固定并常温保存，随即邮寄武汉赛维尔生物科技有限公司进行石蜡切片的制备，几丁质 Fluorescent brightener（FB）28 染色，脂

肪 Hematoxylin-eosin staining （HE）染色，分别在 Nikon Eclipse C1 正置荧光显微镜和 3DHISTECH 公司的 Pannoramic MIDI、Pannoramic 250 FLASH、Pannoramic DESK 仪器上进行全景采集图片，拍照观察，利用 Case Viewer 2.4 软件处理图片，每头幼虫为 1 次重复，每个处理 10 次重复，分别在 40 头幼虫体壁上等距离随机选取 5 个点，对其进行测量统计分析。

1.3 试虫表皮物质的提取和含量分析方法

参照陈长琨（1993）的方法，分析试虫体壁总脂肪、几丁质和总蛋白质的相对含量：分别将 4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫剪头去尾，将虫体沿腹中线纵向剖开去除消化道、脂肪体和肌肉层后，将体壁用蒸馏水冲洗干净，60 ℃烘干至恒质量（W_1），加入 10 倍质量的石油醚分析纯（上海益事达化工有限公司）超声提取 5 min 后，取出溶剂再加入石油醚反复提取 5 次，加入 20-30 倍质量的石油醚振荡提取 8 h。将脱脂后的表皮于 80 ℃烘干至恒质量，用电子天平（BSM22013，上海卓精电子科技有限公司，精确到 0.000 1 g）称质量（W_2），W_1 与 W_2 的差值（W_1 - W_2）为总脂肪含量（W_{12}）。将脱脂后的干表皮用饱和 KOH 溶液甘油浴，160 ℃消化 30 min，碱解蛋白质后剩余透明几丁质残基，流水冲洗，再分别经体积分数 95%和 100%的乙醇脱水，称质量得几丁质含量（W_3）。W_2 与 W_3 的差值（W_2 - W_3）即为总蛋白含量（W_{23}）。

1.4 试虫体壁多酚氧化酶活性测定

试虫体壁多酚氧化酶酶液制备方法（徐广增等，2015）：分别选取 4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫，解剖方法同 1.3。将冲洗干净的体壁放入预冷的研钵中，按 1 g∶5 mL 加入预冷的 0.2 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液，研磨匀浆。在 4 ℃冰箱静置 30 min 后，4 ℃、8 000 r/min 离心 30 min，取上清液酶液，于 0 ℃保存或立即使用。

酶活性测定改进肖婷等（2008）紫外分光光度计法，3 mL 测活体系中包含 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液（pH6.5），0.033 g 邻苯二酚，0.1 mL 待测酶液。将 3 mL 磷酸缓冲液 25 ℃水浴 15 min，加入邻苯二酚混匀后添加 0.1 mL 待测酶液，立即在 420 nm 处测定 5 min 内光密度随时间的增长曲线，每隔 10 s 记录 1 次，从直线的斜率求得酶活力。酶活力单位以 U 表示，为每分钟每毫克蛋白催化底物氧化反应引起吸光度值改变 0.001 为一个酶活力单位。U=ΔA/（mg min）。每组试验均重复 3 次。

1.5 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。采用比较均值中 One-way ANOVA 进行体壁物质质量和含量、体壁物质厚度、多酚氧化酶蛋白含量和酶活力的方差分析，均数之间的多重比较采用 Duncan's 新复极差方法。

2 结果与分析

2.1 幼虫体壁物质质量变化

随着生长发育阶段的变化，松阿扁叶蜂幼虫的体壁总脂肪质量、几丁质质量、总蛋白质质量不断增加，均在蛹前滞育达到最高。蛹前滞育幼虫总脂肪质量显著高于 4 龄、5 龄和入土滞育幼虫（F=9.088，P=0.031）；滞育中幼虫几丁质质量（F=51.656，$P \leqslant 0.001$）和蛋白质质量（F=24.382，P<0.001）显著高于滞育前幼虫（表 1）。

2.2 幼虫体壁物质含量变化

不同发育阶段的松阿扁叶蜂幼虫总脂肪、几丁质、总蛋白质含量变化各有不同（图 1）。随着幼虫发育阶段的推进，总脂肪变化较为平缓，其含量为 11%-21%。

不同发育阶段的松阿扁叶蜂幼虫的体壁几丁质含量为 20%-50%，呈先下降后升高再下降的趋势。4-5 龄幼虫几丁质含量稍有降低，进入滞育后，含量显著升高，入土滞育幼虫含量最高，到蛹前滞育时，几丁质含量略有降低。其中，入土滞育幼虫的几丁质含量分别为 4 龄和 5 龄幼虫的 1.65 倍和 2.44 倍，与 4 龄和 5 龄幼虫差异显著（F=12.604，P<0.001），但与蛹前滞育幼虫无显著差异（F=12.604，P=0.164）。

表 1　幼虫体壁物质质量

Table 1　Substance quality of larval integument

变态类型 Metamorphosis type		总脂肪质量（mg） Total fats quality (mg)	几丁质质量（mg） Chitin quality (mg)	蛋白质质量（mg） Protein quality (mg)
滞育前 Prediapause	4 龄幼虫 4th instar larvae	0.05 ± 0.02 b	0.13 ± 0.07 b	0.07 ± 0.001 b
	5 龄幼虫 5th instar larvae	0.06 ± 0.02 b	0.27 ± 0.08 b	0.08 ± 0.002 b
滞育中 Diapause	入土滞育幼虫 Diapause larvae	0.51 ± 0.16 b	1.74 ± 0.57 a	2.18 ± 0.42 a
	蛹前滞育幼虫 Prepupal diapause larvae	1.04 ± 0.21 a	2.35 ± 0.57 a	2.47 ± 0.55 a

表中数据为平均值±SE，同列数据后不同字母表示在 0.05 水平差异显著（Duncan's 新复极差检验）。下表同。

The data in the table are mean ± SE, and followed by the different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

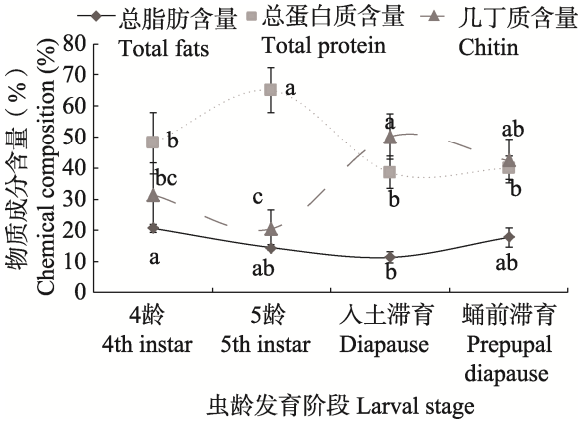

图 1　不同虫龄体壁物质含量变化趋势线

Fig. 1　Change trend line of substance content on larval integument at different instars

图中不同字母表示在 0.05 水平差异显著（Duncan's 新复极差检验）。

The different letters in the figure indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test.

松阿扁叶蜂幼虫不同发育阶段的体壁总蛋白质含量变化波动也较大，呈现先升高后下降再升高的趋势，总蛋白质含量为 38%-65%。5 龄幼虫时最高，为 65.05%，其次为 4 龄幼虫，为 48.06%，入土滞育和蛹前滞育幼虫含量分别为 38.57%和 39.98%。5 龄幼虫体壁总蛋白质相对含量极显著高于 4 龄、入土滞育幼虫和蛹前滞育幼虫（F=17.118，P<0.001）。

图 1 显示总脂肪含量变化较为平缓，几丁质含量与总蛋白质含量变化呈对称轴式互补波动，表明几丁质和蛋白质的互补在体壁防御体系中起着重要作用。

2.3　幼虫体壁物质厚度分析

由表 2 和图 2 可知，4 龄幼虫、5 龄幼虫、入土滞育幼虫和蛹前滞育幼虫体壁几丁质厚度间差异显著（F=968.982，P<0.001），入土滞育幼虫体壁几丁质最厚，表现为 4 龄幼虫体壁几丁质厚度为（9.63 ± 0.40）μm<5 龄幼虫为（23.20 ± 1.71）μm<入土滞育幼虫为（107.67± 4.12）μm，蛹前滞育幼虫几丁质下降。

由表 2 和图 3 可知，4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫体壁脂肪厚度间差异显著（F=8 614.319，P<0.001），入土滞育幼虫体壁脂肪厚度最高，表现为 4 龄幼虫体壁脂肪厚度约为（3.17 ± 0.32）μm<5 龄幼虫为（6.83 ± 0.35）μm<入土滞育幼虫为（69.93 ± 0.96）μm，蛹前滞育幼虫体壁脂肪下降。

表 2　不同发育阶段幼虫体壁物质厚度

Table 2　Substance thickness of larval integument at different instars

变态类型 Metamorphosis type		体壁几丁质厚度 (μm) Chitin thickness of integument (μm)	体壁脂肪厚度 (μm) Fat thickness of integument (μm)
滞育前 Prediapause	4 龄幼虫 4th instar larvae	9.63 ± 0.40 d	3.17 ± 0.32 d
	5 龄幼虫 5th instar larvae	23.20 ± 1.71 c	6.83 ± 0.35 c
滞育中 Diapause	入土滞育幼虫 Diapause larvae	107.67 ± 4.12 a	69.93 ± 0.96 a
	蛹前滞育幼虫 Prepupal diapause larvae	76.57 ± 2.44 b	42.27 ± 0.49 b

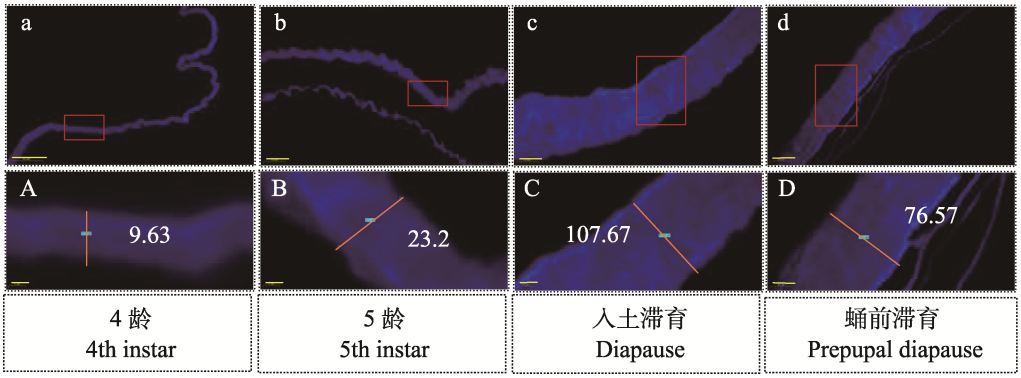

图 2　不同发育阶段幼虫体壁几丁质厚度的 FB 28 染色观察

Fig. 2　Observation of chitin thickness on larval integument by FB 28 staining at different instars

蓝色为几丁质信号；橙色箭头为几丁质在表皮中的厚度；图 a-d 标尺为 50 μm，图 A 与 B 标尺为 5 μm，图 C 与 D 标尺为 20 μm。

Chitin signal appeared blue, and chitin thickness in integument was showed by orange arrows. Scales of Figs. a-d were 50 μm, scales of Figs. A and B were 5 μm, and scales of Figs. C and D were 20 μm.

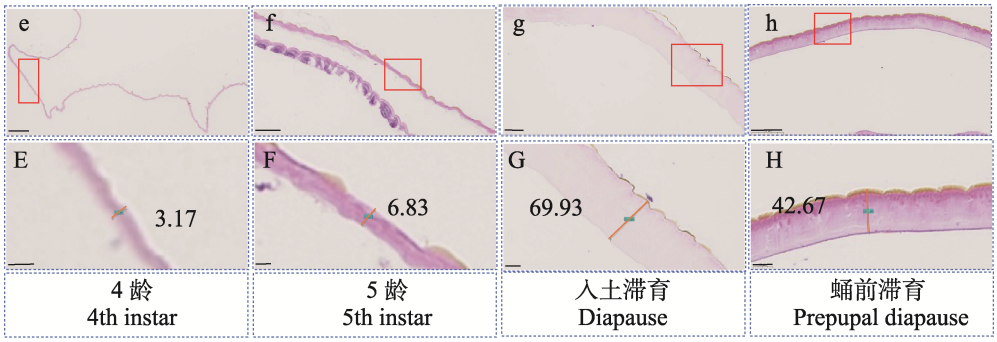

图 3　不同发育阶段幼虫体壁脂肪厚度的 HE 染色观察

Fig. 3　Observation of fat thickness on larval integument by HE staining at different instars

紫色为脂肪信号，橙色箭头为脂肪在表皮中的厚度；图 e-h 标尺为 50 μm，图 E 和 F 标尺为 5 μm，图 G 和 H 标尺为 20 μm。Fat signal appeared purple, and fat thickness on larval integument was shown by the orange arrow. Scales of Figs. e-h were 50 μm, scales of Figs. E and F were 5 μm, and scales of Figs. G and H were 20 μm.

2.4　松阿扁叶蜂幼虫体壁多酚氧化酶活性测定

分别将松阿扁叶蜂不同发育阶段幼虫体壁多酚氧化酶的 A_{595} 值代入标准蛋白质曲线方程中得到图 4。图 4 表明 5 龄和入土滞育幼虫酶液蛋白质含量最高，分别为 0.653 和 0.616 mg/mL，其次为 4 龄幼虫（0.47 mg/mL），蛹前滞育幼虫最少，为 0.338 mg/mL。且 4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫之间均差异显著（F=400.579，P<0.001）。

随着虫龄增加，松阿扁叶蜂幼虫体壁的多酚氧化酶含量呈现先升高后持续降低趋势。在幼虫 5 龄时，其酶含量达到最高，约为 4 龄幼虫的 1.39 倍，是入土滞育幼虫酶含量的 1.05 倍，蛹前滞育酶含量的 1.91 倍。

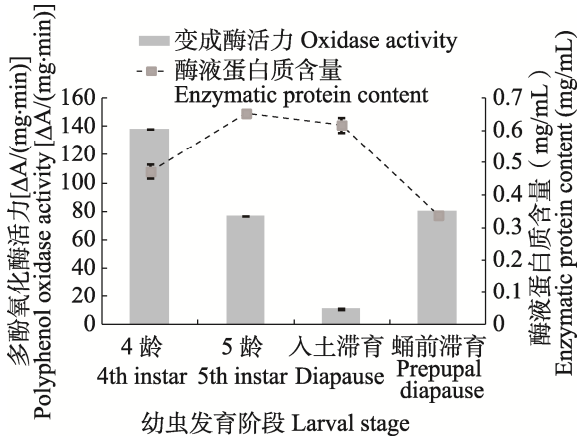

图 4　不同发育阶段幼虫体壁酶液蛋白质含量及活性变化趋势

Fig. 4　Changes of protein content and activity on PPO on larval integument at different instars

图 4 表明松阿扁叶蜂不同虫态体壁的多酚氧化酶活力明显不同，4 龄、5 龄、入土滞育和蛹前滞育幼虫的多酚氧化酶活力分别为（137.71±0.02）、（76.57±0.01）、（10.55±0.02）和（79.88±0.01）ΔA/(mg·min)，4 龄幼虫活力最高，随着幼虫发育，酶活力降低，入土滞育幼虫酶活力最低，蛹前滞育幼虫酶活力又开始升高。4 龄幼虫酶活力分别是 5 龄幼虫、入土滞育幼虫和蛹前滞育幼虫的 1.80、13.05 和 1.72 倍。随着幼虫发育阶段的推进，其体壁多酚氧化酶含量和活力变化波形趋势近似互补形式。

3　讨论

昆虫体壁作为昆虫体躯直接与外界环境接触的部分，是昆虫的“保护层”，真菌、细菌、药物等要对昆虫产生作用，必须穿透和破坏保护层，才能引发昆虫感染或致死。几丁质、蛋白质和脂类物质是体壁的重要保护物质（Wrońska *et al.*，2018）。本研究发现，松阿扁叶蜂幼虫表皮总脂肪含量为 11%-21%，总蛋白质含量为 39%-65%，几丁质含量为 20%-50%。研究结果与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 幼虫表皮蛋白质 62.61%和几丁质 31.37%含量相似，但脂肪 5.66%含量相差甚远（钟国华等，2004）；与黄粉虫 *Tenebrio molitor* 幼虫体壁几丁质含量 4.36%相差较大（吴福中，2007）；与椰心叶甲 *Brontispa longissima* 幼虫表皮总脂肪含量 11.80%和蛋白质相对含量 58.10%相似，但几丁质含量 13.26%差距较大（孙蕊芬等，2010）。因此，不同种类昆虫体壁的化学成分含量不相同。

不同昆虫种类，其体壁化学成分含量不同，表现在组织和发育阶段的特异性，表皮蛋白与几丁质结合存在特异性，表皮蛋白在不同发育阶段（如非滞育和滞育条件下）的结构重建和某些器官的发生方面发挥不同作用（付丹影等，2016；申建梅等，2017；卜云飞，2019）。本研究结果表明，松阿扁叶蜂 4 龄幼虫至蛹前滞育幼虫总脂肪含量变化较为平缓，几丁质在非滞育期比滞育期含量低，蛋白质正好相反，在非滞育期比滞育期含量高，5 龄时蛋白含量最高。研究表明二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫、麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 幼虫蛋白含量呈现入土滞育期低于老熟幼虫入土前（成卫宁等，2008；强承魁等，2008）的观点一致，关于昆虫几丁质的变化以及几丁质和蛋白变化关联的变化规律还未知。本研究中，在松阿扁叶蜂幼虫生长发育过程中，其体壁防御物质不断积累，至滞育时囤积量最大，以保证其在土壤中顺利越冬。松阿扁叶蜂幼虫体壁几丁质和脂肪厚度也均在滞育期最厚，以作为第一道防线防止外来物的入侵。松阿扁叶蜂幼虫随着发育阶段的推进，其总脂肪含量变化平缓，几丁质和蛋白质含量变化曲线正好相反，波形上呈现互补波动，表明这种互补在滞育期和非滞育期构建表皮防御系统时起着重要的作用。表皮蛋白通过与几丁质形成特异性共价结合，提高了表皮结构的稳定性（Neville，1975），保护幼虫安全越冬。

多酚氧化酶分布于昆虫的血细胞、血浆和表皮等组织中（Binnington and Barrett，1988），参与昆虫体壁硬化、黑化（Hans *et al.*，1991；Hearing and Jiménez，2004）、变态发育和免疫防御（Ashida and Yamazaki，1990）。本研究结果表明，松阿扁叶蜂末龄幼虫非滞育状态体内 PPO 含量高于老熟幼虫滞育状态，其活性变化曲线相反，波形互补。松阿扁叶蜂在末龄幼虫期 PPO 活性最高，与家蚕和野桑蚕大龄幼虫体壁 PPO 活性高的结果一致（毛钰霞等，2017）。家蚕大龄幼虫眠起时体壁中的 PPO 活性高于眠中，本研究中松阿扁叶蜂蛹前滞育代表滞育终止末期，类似于家蚕眠起，蛹前滞育的 PPO 高于滞育中，两者观点一致，这说明新体壁开始形成时就已经有 PPO 从血淋巴向体壁中转运，并贮存在新表皮中（鲁成等，2002）。

幼虫体壁中蛋白-几丁质共价结构及 2 种物质含量互补、PPO 蛋白含量-活力互补共同构成了幼虫体壁防御系统。滞育前，幼虫要经历蜕皮，体壁总蛋白质和几丁质 2 种物质含量相差较大，蛋白质-几丁质共价结合形成的体壁稳定性低。此时，幼虫体壁总蛋白含量和 PPO 蛋白含量较高，且酶活力较大，对于滞育前裸露在树枝的幼

虫，体壁 PPO 保持高活性状态能避免体壁受外界因素干扰，及时参与体壁黑化及伤口修复。因此，滞育前，幼虫体壁通过“蛋白质-几丁质低稳定性结构+PPO 高活性”实现免疫防御。

在滞育期内，体壁 PPO 酶活力最低，参与体壁黑化及伤口修复的能力降低。此时，幼虫体壁总蛋白质和几丁质两种物质的含量较非滞育期相差较低，加之 PPO 参与体壁鞣化，蛋白质-几丁质共价结合形成的体壁稳定性高，在滞育期间幼虫体壁通过“蛋白质-几丁质高稳定性结构+低 PPO 活性”实现免疫防御。

在发育起点以上的蛹前滞育（滞育终止末期），体壁总蛋白含量稳定，PPO 含量最低，活性却增加，推测滞育后发育时，幼虫为储备新表皮，启动多酚氧化酶高活状态，机体已经开始从血淋巴将多酚氧化酶转移至体壁，幼虫重新通过“蛋白质-几丁质的低稳定性结构+PPO 高活性”实现免疫防御。

因此，松阿扁叶蜂幼虫在非滞育期防御模式为“蛋白质-几丁质的低稳定性结构+PPO 高活性”模式，滞育期以“蛋白质-几丁质高稳定性结构+低 PPO 活性”为防御模式。

参考文献 (References)

Andersen SO, 2010. Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 166–178.

Ashida M, Yamazaki H, 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: With specialreference to its activation//Ohnishi E, Ishizaki H(eds.). Molting and Metamorphosis. Tokyo: Sientific Societies Press. 239–265.

Binnington KC, Barrett FM, 1988. Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Tissue Cell*, 20(3): 405–419.

Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH, Lee JY, Lidholm DA, 1991. Cell-free immunity in Cecropia: A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry*, 201(1): 23–31

Brown JJ, Chippendale GM, 1978. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochemistry*, 8(5): 359–367.

Bu YF, 2019. Expression, purification and chitin-binding mode of CPR family cuticular proteins of *Ostrinia furnacalis*. Master dissertation. Dalian: Dalian University of Technology. [卜云飞, 2019. 亚洲玉米螟 CPR 家族表皮蛋白的表达纯化及与几丁质的相互作用. 硕士学位论文. 大连: 大连理工大学.]

Chen CK, 1993. Methods of Insect Physiology and Biochemistry. Beijing: Agriculture Press. 11–15. [陈长琨, 1993. 昆虫生理生化实验. 北京: 农业出版社. 11–15.]

Cheng WN, Li YP, Li JJ, Li XL, Wu JX, Wang HL, 2008. Protein contents and electrophoresis patterns of the pre-diapause larvae in the wheat blossom midge *Sitodiplosis mosellana* Gehin. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(2): 155–159. [成卫宁, 李怡萍, 李建军, 李修炼, 仵均祥, 王洪亮, 2008. 小麦吸浆虫滞育前后和滞育后期蛋白含量及其电泳分析. 植物保护学报, 35(2): 155–159.]

Fu DY, Si FL, Chen B, Xu YL, Hao YJ, 2016. Transcriptome-guided identification of the cuticular protein gene family of *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) and expression analysis under non-and winter-diapause conditions. *Acta Entomologica Sinica*, 59(2): 172–184. [付丹影, 司风玲, 陈斌, 徐燕玲, 郝友进, 2016. 基于转录组的葱蝇表皮蛋白基因家族的鉴定及在非滞育和冬滞育条件下的表达分析. 昆虫学报, 59(2): 172–184.]

Fujisawa H, Okuno S, 2005. Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 338(1): 271–276.

Gao F, Zhu Q, Chen HY, Han GR, Yu FX, 2011. Study on biology feature of *Acantholyda posticalis* Matsumura at different altitudes. *Journal of Green Science and Technology*, 2011(11): 86–89. [高锋, 朱强, 陈海燕, 韩光荣, 于凤霞, 2011. 不同海拔高度松阿扁叶蜂生物学特性研究. 绿色科技, 2011(11): 86–89.]

Hans G, Boman, Faye I, Gudmundsson, Lee JY, Lidholm DA, 1991. Cell-free immunity in Cecropia: a model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry*, 201: 23–31.

Hearing VJ, Jiménez M, 1987. Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *International Journal of Biochemistry*, 19(12): 1141–1147.

Howard RW, Blomquist GJ, 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50: 371–393.

Katarzyna WA, Irena BM, Emilia W, Michalina K, Agata K, Katarzyna Z, Loor JJ, 2018. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus*. *PLoS ONE,* 13(3): 1–16.

Li B, Liu YL, 2014. Occurrence and control of *Acantholyda posticalis* Matsumura at Lushan forestry station in Zibo City. *Practical Forestry Technology*, 2014(1): 41–42. [李兵, 刘艳玲, 2014. 淄博市鲁山林场松阿扁叶蜂发生与防治. 林业实用技

术, 2014(1): 41–42.]

Liang ZG, Xu YY, Sun XG，Zhang TX, Zhang WG, XuYX, 2005. The cold hardiness of overwintering larvae of *Acantholyda posticalis* Matsumura (Hymenoptera: Pamphiliidae) in Taian. *Acta Ecology Sinica*, 25(12): 3259–3263. [梁中贵, 许永玉, 孙绪艮, 张同心, 张卫光, 徐延熙, 2005. 泰安地区松阿扁叶蜂越冬幼虫抗寒性. 生态学报, 25(12): 3259–3263.]

Lu C, Yu SH, Xiang ZH, 2002. Molecular systematic studies on Chinese mandarin silkworm (*Bombyx mandarina* M.) and domestic silkworm (*Bombyx mori* L.) *Scientia Agricultura Sinica*, 35(1): 94–101. [鲁成, 余仕红, 向仲怀, 2002. 中国野桑蚕和家蚕的分子系统学研究. 中国农业科学, 35(1): 94–101.]

Mao YX, Zhao XM, Xu YX, Shen WD, Wei ZG, 2017. Analysis of polyphenol oxidase activity in hemolymph and integument during late developmental stage of different *Bombyx mori* Varieties and *Bombyx mandarina* larvae. *Science of Sericulture*, 43(5): 782–788. [毛钰霞, 赵晓明, 许雅香, 沈卫德, 卫正国, 2017. 不同家蚕品种与野桑蚕大龄期幼虫血淋巴和体壁中的多酚氧化酶活性检测分析. 蚕业科学, 43(5): 782–788.]

Neville AC, 1975. The Biology of the Arthropod Cuticle. Berlin: Springer Berlin Heidlberg. 58–102.

Qiang CK, Du YZ, Yu LY, Cui YD, Lu MX, Zheng FS, 2008. Dynamic changes of cold-resistant substances of overwintering *Chilo suppressalis* (Walker) larvae. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 19(3): 599–605. [强承魁, 杜予州, 于玲雅, 崔亚东, 陆明星, 郑福山, 2008. 水稻二化螟越冬幼虫耐寒性物质的动态变化. 应用生态学报, 19(3): 599–605.]

Shen JM, Chen BH, Guo XJ, Hu LM, 2017. Cloning and expression of *Plutella xylostella*（Linnaeus）cuticular protein gene. *Journal of Southern Agriculture*, 48(12): 2176–2181. [申建梅, 陈炳翰, 郭晓洁, 胡黎明, 2017 小菜蛾表皮蛋白基因克隆及表达谱分析. 南方农业学报, 48(12): 2176–2181.]

Sun RF, Gong SH, Jiang YY, Zhu L, 2010. Influence of parasitoid wasp on integument components of *Brontispa longissima* (Gestro) larvae. *Journal of Hainan Normal University* (*Natural Science*), 23(3): 306–307, 350. [孙蕊芬, 龚声辉, 姜迎娅, 朱麟, 2010. 椰心叶甲幼虫被寄生后体壁主要物质含量的变化. 海南师范大学学报 (自然科学版), 23(3): 306–307, 350.]

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS, 2004. Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25(6): 289–294.

Vincent HR, Ring TC, 2009. Encyclopedia of Entomology. London: Elsevier Academic Press. 245–246.

Vincent JFV, Wegst UGK, 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure and Development*, 33(3): 187–199.

Voolma K, Hiiesaar K, Williams IH, Ploomi A, Jõgar K, 2016. Cold hardiness in the pre-imaginal stages of the great web-spinning pine-sawfly *Acantholyda posticalis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 18(4): 432–436.

Wigglesworth VB, 1975. Incorporation of lipid into the epicuticle of *Rhodnius* (Hemiptera). *Journal of Cell Science*, 19(3): 459–485.

Wroń ska AK, Boguś MI, Wł ó ka E, Kazek M, Kaczmarek A, Zalewska K, 2018. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus*. *PLoS ONE*, 13(3): e0192715.

Wu FZ, 2007. Studies on optimization of rearing condition and chitin content of *Tenebrio molitor* L's larvae. Master dissertation. Hefei: Anhui Agricultural University. [吴福中, 2007. 黄粉虫幼虫饲养条件的优化和几丁质含量的研究. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学.]

Xiao GR, Li ZY, 2020. Chinese Forest Insects (3rd edition). Beijing: China Forestry Publishing House. 14.[萧刚柔, 李镇宇, 2020. 中国森林昆虫(第三版). 北京: 中国林业出版社.14.]

Xiao T, Liu SZ, Xue CB, Luo WC, 2008. The comparison of colorimetry and microtitration methods for defermining the protein content and activity of phenoloxidase in insect hemolymph test. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(2): 306–309. [肖婷, 刘守柱, 薛超彬, 罗万春, 2008. 紫外分光光度计法与酶标仪微量法测定酚氧化酶蛋白含量及活力比较. 昆虫知识, 45(2): 306–309.]

Xu GZ, Li W, Wang XH, Liu SZ, Wang GQ, 2015. Characteristics of phenoloxidase from *Spodoptera litura*. *Plant Protection*, 41(3): 45–49, 63. [徐广增, 李伟, 王新红, 刘守柱, 王桂清, 2015. 斜纹夜蛾酚氧化酶酶学特性研究. 植物保护, 41(3): 45–49, 63.]

Zhang GH, 2008. The studying on some biology characteristics and trehalose metabolism of *Acantholyda posticalis*. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [张桂华, 2008. 松阿扁叶蜂部分生物学和越冬幼虫海藻糖代谢的研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Zhong GH, Liu JX, Guan S, Xie JJ, Hu MY, 2004. Effects of rhodojaponins from *Rhododendron molle* on cuticle components of *Spodoptera litura* larvae and their structure-activity relationship. *Acta Entomology Sinica,* 47(6): 705–714. [钟国华, 刘金香, 官珊,谢建军, 胡美英, 2004. 闹羊花素类化合物对斜纹夜蛾幼虫表皮成分的影响及构效关系. 昆虫学报, 47(6): 705–714.]