环境昆虫学报 2022，44（6）：1517－1527
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2022. 06. 22

蔡霓，龙秀珍，刘蓉，吴雨欣，曾宪儒，农向群，王广君，涂雄兵，张泽华. 一株白僵菌对红火蚁的毒力及对免疫酶活性与基因表达的影响［J］. 环境昆虫学报，2022，44（6）：1517－1527.

一株白僵菌对红火蚁的毒力及对免疫酶活性与基因表达的影响

蔡 霓[1*]，龙秀珍[2*]，刘 蓉[1]，吴雨欣[3]，曾宪儒[2]，农向群[1**]，王广君[1]，涂雄兵[1]，张泽华[1]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 广西农业科学院植物保护研究所，南宁 530007；3. 长江大学农学院，湖北荆州 434000）

摘要：白僵菌是最具防治害虫潜力的一类昆虫病原真菌。本研究测定了球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 237 菌株对红火蚁 *Solenopsis invicta* 的感染毒力，并探究了白僵菌侵染对红火蚁免疫相关酶活性及相关基因表达的影响。结果显示，该白僵菌菌株对红火蚁的毒力较强，在孢子悬浮液 10^8 孢子/mL 浓度下，对红火蚁的致死中时间 LT_{50} 为 5.288 ±0.2014 d；在 10^4 ~ 10^8 孢子/mL 的不同浓度处理下，红火蚁死亡率随孢子浓度的增加而显著增加。经计算，第 4 ~ 10 天致死中浓度 LC_{50} 值由 8.82×10^6 孢子/mL 降低到 8.95×10^5 孢子/mL。红火蚁被球孢白僵菌感染后，体内保护酶和解毒酶发生了不同程度的改变。其中保护酶类酚氧化酶（PO）的活性在白僵菌处理后的第 12 h 已出现抑制，而在第 24 h、48 h、72 h 时均显著高于对照；超氧化物歧化酶（SOD）活性在 12 h 时与对照无显著差异，但在 24 ~ 48 h 阶段酶活显著上升，之后下降；过氧化物酶（POD）在较早时段保持与对照无显著差异水平，至中后期 48 ~ 72 h 出现持续升高。解毒酶类混合功能氧化酶系（MFO）的活性在整个检测时间段内表现为抑制－上升－抑制－上升的波动状态；谷胱甘肽 S-转移酶（GSTs）活性的变化与 SOD 相似，只在 24 ~ 48 h 阶段出现上升。白僵菌还导致红火蚁免疫信号通路 Toll 途径相关基因表达量变化。在处理后 12 h，识别因子 GNBP1、Spaetzle 即被激活，维持上调－回调波动趋势；而信号传递因子 Myd88、pelle 在检测的 12 ~ 72 h 内基本处于被抑制状态，只有 Myd88 在 48 h 时表达量上升；转录因子 Dorsal 以及抗菌肽 Defensin 在 12 ~ 24 h 都已被显著激活，而在后续 48 ~ 72 h 被抑制。综上所述，球孢白僵菌 237 菌株通过调节红火蚁酶活以及免疫相关基因的表达量实现成功侵染和致病作用，具有很高的生防应用价值。

关键词：球孢白僵菌；红火蚁；毒力；酶活；Toll 通路；免疫
中图分类号：Q968.1；S433；S476　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2022）06－1517－11

Virulence and regulating immune-associated enzyme activity and gene expression of a *Beauveria bassiana* strain against red fire ants

CAI Ni[1*], LONG Xiu-Zhen[2*], LIU Rong[1], WU Yu-Xin[3], ZENG Xian-Ru[2], NONG Xiang-Qun[1**], WANG Guang-Jun[1], TU Xiong-Bing[1], ZHANG Ze-Hua[1] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China)

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFD1000500）

[*] 共同第一作者：蔡霓，女，博士，研究方向为农业害虫生物防治，E－mail：15027173107@163.com；龙秀珍，硕士，副研究员，研究方向为农业害虫与害虫防治，E－mail：longxiuzhen2006@163.com

[**] 通讯作者 Author for correspondence：农向群，女，博士，研究员，主要研究方向为昆虫病原真菌及其应用，E－mail：xqnong@sina.com

收稿日期 Received：2022－09－15；接受日期 Accepted：2022－10－23

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Abstract: *Beauveria* is one genus of the most promising entomopathogenic fungi for pest bio-control. In this study, the virulence of *Beauveria bassiana* 237 strain to red fire ant *Solenopsis invicta* was determined, and the effects of the fungal strain on immune-related enzyme and gene expression level of the infected *S. invicta* was investigated. The results showed that *B. bassiana* 237 strain was highly virulent to red fire ants. At the fungal concentration of 10^8 spores /mL, the lethal medium time (LT_{50}) of red fire ants was 5.288 ± 0.2014 d. Under different concentrations of 10^4 ~ 10^8 spores /mL, the death rate of red fire ants increased significantly with the increase of spore concentration. The lethal medium concentration (LC_{50}) decreased from 8.82×10^6 spores /mL to 8.95×10^5 spores /mL during the 4th to 10th day. After infected by *B. bassiana*, the protective enzymes and detoxification enzymes in red fire ants were changed to different degrees. The activity of phenol oxidase (PO), a protective enzyme, was inhibited at the 12th h after treatment with *B. bassiana*, but was significantly higher than that of the control at the 24th, 48th and 72th. The activity of superoxide dismutase (SOD) was not significantly different from that of the control group at 12 h, but increased significantly at 24 ~ 48 h and then decreased. The level of peroxidase (POD) was not significantly different from that of the control at the early stage, but subsequently increase at 48 ~ 72 h in the middle and late stage. For two detoxification enzymes tested, the activity of detoxification enzyme mixed functional oxidase system (MFO) fluctuated in a state of inhibition-increase-inhibition-increase during the whole detection period. The change of glutathione S-transferase (GSTs) activity was similar to SOD, and only increased at 24 ~ 48 h. In addition, *B. bassiana* also caused changes in the expression of immune-related genes of Toll signaling pathway in red fire ants. The genes of recognition factors GNBP1 and Spaetzle were activated at 12 h after treatment, maintaining an alternate up and down trend. The signal transfer factors, Myd88 and pelle, were overall suppressed during the 12 ~ 72 h detection, but only Myd88 increased expression at 48 h. The transcription factor Dorsal and the antimicrobial peptide Defensin have been significantly activated at 12 ~ 24 h then inhibited at 48 ~ 72 h. In conclusion, *B. bassiana* 237 strain successfully infected and caused disease to red fire ants by regulating the enzyme activity and the expression of immune-related genes in red fire ant, which has a high value of biocontrol application.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Solenopsis invicta*; virulence; enzyme activity; Toll pathway; immunity

红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 是一种危险的外来入侵害虫，入侵我国后迅速适应环境并扩散繁殖。其蚁巢常驻在农田、林地、果园、草坪、荒地、路边等地，也常见于在人口密集的居民区及校园内等公共地带，还存在于地面电气箱体内、电线等一些基础设施中（罗礼智，2005；江世宏等，2005），不仅对农、林业和生态环境造成重大损害，在遭受惊扰时还会攻击人畜，对居民和公园游客构成生命安全威胁（Vinson and Mackay，1990）。由于该蚁繁殖力强，在新入侵地缺乏有效的天敌抑制，其种群快速扩张，至今难以达到有效的可持续防治。

昆虫病原真菌白僵菌属 *Beauveria* 被认为是红火蚁生物防治最有前途的病原性天敌（Lofgren *et al.*，1975）。已知它们的寄主覆盖了绝大多数昆虫的目类及其科类，包含膜翅目 Hymenoptera 蚁科 Formicidae，种类达 700 多种（Arthurs and Dara，2019）。1986 年报道了野外调查发现球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和微孢子菌类的变形孢菌 *Vairimorpha invictae* 能够侵染红火蚁（Jouvenaz and Ellis，1986）。1987 年报道了从巴西 Matto Grosso 和 Sao Paul 地区采集的球孢白僵菌、布氏白僵菌 *B. brongniartii* 和金龟子绿僵菌 *M. anisopliae* 对 2 种红火蚁（*S. invicta* 和 *S. saevissima*）均有较高的致病性，接种后 4 ~ 10 d 发病率达到高峰（Perinotto *et al.*，2012）。1988 年报道了 3 个从 *S. invicta* 分离的球孢白僵菌菌株也同时能够高效感染上述 2 种红火蚁（Alves *et al.*，1988）。我国大陆于 2004 年底首次发现红火蚁传入（曾玲等，2005；农业部，2005）。2006 年报道了几种分离自白蚁的

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

白僵菌和绿僵菌对红火蚁具有较强的致病力，喷施 1×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液后，15 d 的累计死亡率均达到 86% 以上（刘晓燕，2007）。用11 株球孢白僵菌菌株在 1×10^7 孢子/mL 菌悬液处理红火蚁时，10 d 后导致 6.5% ~67.1% 死亡率（吴志鹏和童应华，2020）。此外，使用球孢白僵菌 1×10^8 孢子/mL 处理红火蚁时，在温度 21℃、25℃和 29℃条件下 15 d 均能导致 100% 死亡率（刘晓燕等，2014）。这些实验结果显示了球孢白僵菌对红火蚁防治的突出能力。

白僵菌对昆虫寄主的侵染和致病的过程一般要经历几个阶段，即分生孢子附着、萌发、穿透表皮，随后菌丝在血腔内生长，摄取营养，产生毒素，破坏寄主组织。此过程中昆虫寄主的防御系统会产生应答和抵抗作用，通过细胞反应和体液反应来抵抗外源物的入侵（杨晓峰等，2008）。昆虫天然免疫分为体液免疫（cellular immune）和细胞免疫（humoral immune），两者共同识别并清除病原物（Lemaitre and Hoffmann，2007；Rosales，2017）。在细胞免疫过程中，昆虫血细胞激发酚氧化酶（PO）的级联反应，多酚氧化酶（PPO）活化后形成 PO，激活的 PO 将酪氨酸羟基化为多巴，多巴再被氧化为多巴色素、二羟吲哚，最后形成黑色素，这些黑色素协同具有细胞毒性的醌类中间产物沉积到入侵的病原体周围，起到隔离杀死病原体的作用（杨松等，2003）。除此之外，对于真菌入侵过程中释放的效应分子和毒素，寄主的一些保护酶如 POD、SOD、CAT 及解毒酶 GSTs、MFO、AchE 等也会参与免疫过程（李毅平和龚和，1998；Zhou *et al.*，2018）。体液免疫主要包括 Toll、IMD、JAK/STAT 和 JNK 信号通路，也与凝集、黑化反应及活性氧产生密切相关（Lemaitre and Hoffmann，2007）。Toll 通路是一条在进化上保守的信号通路，该通路的模式识别蛋白 GNBP1 和 PGRP-SA/SD 与病原物结合后，激活胞外细胞因子 SPZ（spätzle-like proteins）与细胞膜上的 Toll 受体结合，致使胞浆蛋白（MyD88、Tube、Pelle）及其他物质在胞内聚集（Lemaitre and Hoffmann，2007；Cao *et al.*，2015）。随后，抑制因子 Catcus 发生磷酸化，再通过水解后与 NF-kB 转录因子 Dif/Dorsal 分开，Dif/Dorsal 进入细胞核诱导防御素 Defensin 等抗菌肽及其他应答分子基因的表达（Lindsay and Wasserman，2014），进而激活昆虫的免疫。白僵菌需要克服寄主免疫反应以达到成功侵染和致病。关于球孢白僵菌对红火蚁的致病机理目前未见报道。

笔者所在实验室发现了 1 株分离自稻飞虱的球孢白僵菌具有感染红火蚁的毒力，因此，本研究在室内检测评价了该菌株对红火蚁的致病性，并测定了红火蚁被感染后体内保护酶、解毒酶活性和 Toll 通路相关基因的表达变化，为进一步探究球孢白僵菌对红火蚁的作用机理提供基础数据。

1　材料与方法

1.1　供试菌株及孢子培养

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 237 菌株由本实验室分离鉴定并保存。

将供试菌株的孢子悬液涂布在铺有灭菌玻璃纸的 SDAY（1 L 培养基中含蔗糖 20 g，酵母粉 5 g，土豆 200 g 削皮煮水，琼脂粉 20 g）平板上，25 ± 1℃恒温培养 10 d，待其充分产孢后将玻璃纸上的孢子粉刮下，称取适量孢子粉，备用。

1.2　供试昆虫

红火蚁工蚁采集自广西南宁市西乡塘区广西壮族自治区农科院科研试验基地，用火腿肠诱集法采集工蚁，并在室内饲养一段时间，待种群稳定后挑取大小基本一致的健康蚁用于试验。

1.3　杀虫活性测定

采用浸渍法。用含 0.05% 吐温-80 的无菌水将菌株孢子配制成孢子悬浮液，经血球计数板计数后调整至 1×10^8 孢子/mL 浓度。选取大小基本一致的红火蚁工蚁浸入配制好的悬浮液中，5 s 后取出，放入垫有湿润滤纸的塑料杯中，杯口周围涂有一层特氟龙防止红火蚁逃逸。每杯接入试虫约 50 头，重复 3 次。同时以 0.05% 吐温-80 的无菌水处理作为对照。杯内放置塞有棉花的灭菌“水试管”和 10% 蔗糖水的 5 mL 试管各 1 支，于室温 27 ~30℃饲养，每天观察记录死亡的试虫数量，连续观察 10 d。根据处理时间和累计死亡率建立线性回归方程，并计算致死中时间 LT_{50}。

测定致死中浓度时，将 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液按 1∶9 依次稀释成 10^7、10^6、10^5、10^4 孢子/mL，获得 5 个递减的浓度梯度。接种处

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

理和观察方法同上述。应用时间 - 剂量 - 死亡率模型进行模拟分析（冯明光，1998），再用拟合的剂量效应和时间效应参数估计随时间变化的致死中浓度 LC_{50}。

1.4 红火蚁体内保护酶与解毒酶活性测定

1.4.1 样品处理

按照与 1.3 相同方法的处理红火蚁，所用孢子悬浮液为 1.0×10^7 孢子/mL，以无菌 0.05% 吐温-80 的水溶液为空白对照，采用浸渍法接种。浸渍处理后，每杯接入试虫大于 200 头，重复16 杯，分成 4 组，每组 4 杯重复。分别于 12、24、48、72 h 取样，每个重复取样 50 头。将取样管放入液氮罐冷冻，再转放至 -80℃冰箱中保存待用。

1.4.2 酶活测定

每处理取 150 头红火蚁，于液氮中研磨均匀，分装成 6 份小样，每份 0.1 g，用于酶活检测及总 RNA 的提取。

保护酶活性测定：超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化物酶（POD）试剂盒购自北京索莱宝生物工程公司，酚氧化酶（PO）试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司，操作步骤按说明书的方法进行。每个样本重复测定 5 次。

解毒酶活性测定：多功能氧化酶（MFO）试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司，谷胱甘肽 S-转移酶（GSTs）试剂盒购自北京索莱宝生物工程公司，操作步骤按说明书的方法进行。每个样本重复测定 5 次。使用 VersaMax（美谷分子仪器（上海）有限公司）酶标仪读取待测样品的吸光值，根据说明书上的计算方法计算各个酶活。

1.5 红火蚁免疫信号通路相关基因表达量检测

1.5.1 RNA 提取及反转录

取上述 1.4.1 研磨好的红火蚁组织样品 0.1 g，利用 TRIzol© 分离试剂盒（Invitrogen）提取总 RNA。用 5 × All-In-One RT Master Mix 反转录试剂盒（Applied Biological Materials Inc.，Canada）进行 RNA 反转录，得到 cDNA。并用 NanoPhotometer 微量分光光度计（IMPLEN，德国）检测浓度。

1.5.2 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

拟检测红火蚁 Toll 通路相关基因的表达量，包括上游 *GNBP1* 与 *Spaetzle* 基因、信号传递的 *Myd88* 与 *pelle*，下游的转录因子 *Dorsal* 以及抗菌肽 *Defensin* 基因。基因 *ef1-beta*（translation elongation factor 1）作为内参基因（Cheng *et al.*，2013），各基因引物序列见表 1。

表 1 免疫基因及其特异性引物

Table 1 Immune related genes and specific primers

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
ef1-beta	5′-TGAAGACCGATAAGGGCA	*Pelle*	5′-GCTGGTGCTTGGATGAAATA
	5′-TCGTCCGAACCAAAGAGA		5′-CTGCTTGCGTGATAAGTTCTG
GNBP1	5′-GTGAACGCTACAGATGTTTCG	*Dorsal*	5′-TACGGTTTCGCTATGAATGC
	5′-CGCCGAGAGTGATAAAGAACT		5′-AAGATTGTGCGGATGAGGTC
Spaetzle	5′-TTTCAAGCACAGGCTCACC	*Defensin*	5′-CAGGCAAATGAAGACGGA
	5′-ATCAACGCTCTCCAGGAACC		5′-TGAGGATACAGTGAGCAGCG
Myd88	5′-TCAAGTGTCAGCAGAGCCA		
	5′-TTCATTACCGCTTCGTGC		

qRT-PCR 使用美国 EVER-BRIGHT© INC. 的 2 × SYBR Green qPCR Master Mix 进行，并使用 ABI QuantStudio 5 系统根据制造商说明进行检测。反应体系为 2 × SYBR Green Master Mix 10 μL，正反向引物各 1 μL，cDNA 0.8 μL，补足 ddH_2O 至 20 μL。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 2 min；95℃ 变性 5 s，60℃ 复性 30 s，40 个循环。每样品 3 次技术重复，基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行分析。所有结果以平均数 ± 标准误（SE）表示，采用 Duncan's multiple-range test 检验（SPSS 26.0）的单因素方差分析认为 $P < 0.05$ 差异显著。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果与分析

2.1　球孢白僵菌对红火蚁的毒力

球孢白僵菌 237 菌株对红火蚁的生物测定显示，该菌株对红火蚁有较高的毒力。处理后第 3 天开始出现死亡，死亡率为 10%，从第 3 天到第 10 天，每天的累计死亡率都显著高于对照（$P < 0.05$）。处理后第 7 天死亡率达到 83.3%，第 10 天的死亡率为 87%（图 1）。死亡率－时间的回归方程为 $y = 11.624x - 11.333$，致死中时间 LT_{50} 为 5.288 ±0.2014 d，表明该菌株对红火蚁能够有较好的防治效果。

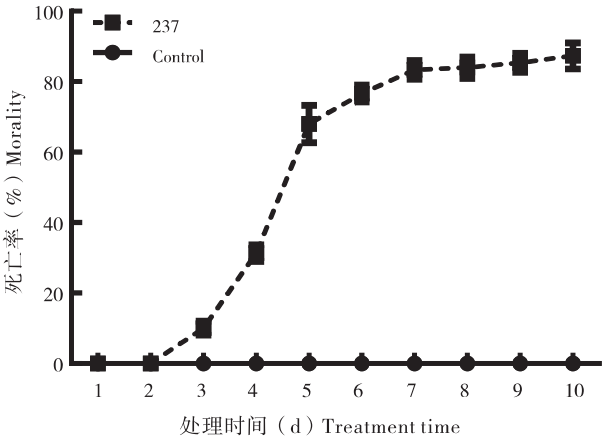


图 1　球孢白僵菌 237 菌株处理下红火蚁的死亡率

Fig. 1　Mortality of *Solenopsis invicta* treated by *Beauveria bassiana* 237 strain

在球孢白僵菌不同浓度处理下，红火蚁第 3 天各个处理组开始出现死亡。随着浓度的升高，死亡速度逐渐加快。其中 1.0×10^8 孢子/mL 处理下，第 4 天红火蚁的死亡率已大于 50%（为 65.66%），1.0×10^7 孢子/mL 处理组到第 5 天死亡率也达到 54.35%，其余较低浓度处理组到第 10 天时死亡率均未超过 50%（图 2）。对各个浓度处理下累计死亡率进行差异显著性分析后发现，不同浓度的白僵菌对红火蚁的致死率在第 4 天开始出现显著性分化，1.0×10^8 孢子/mL 处理组死亡率显著高于其他浓度（表 2）。从致死中浓度 LC_{50} 来看，随着处理时间的增长，LC_{50} 值下降，接菌后 4～7 d，LC_{50} 值由 8.82×10^6 孢子/mL 降低到 1.41×10^6 孢子/mL，第 7～10 天的 LC_{50} 值继续下降，第 10 天的 LC_{50} 仅为 4 d 时的 10.1%（表 3）。说明白僵菌 237 菌株对红火蚁的杀虫毒力存在浓度正相关性。

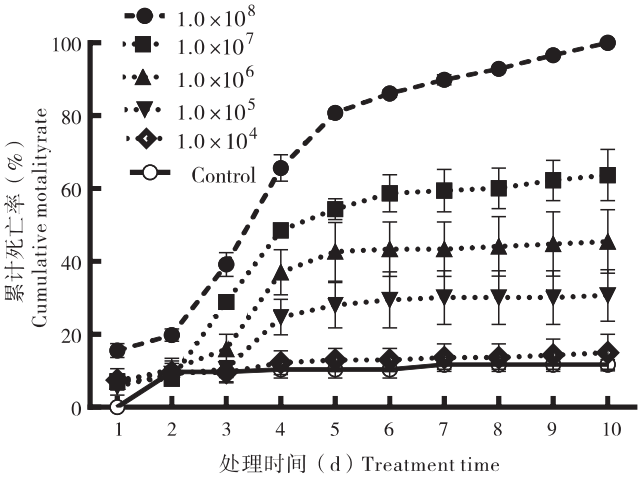


图 2　球孢白僵菌 237 菌株不同浓度处理下红火蚁的死亡率

Fig. 2　Cumulative mortality of *Solenopsis invicta* under different concentrations of *Beauveria bassiana* 237 strain condidia

表 2　各浓度累计死亡率差异显著性分析

Table 2　Analysis of the significance of differences in cumulative mortality among different concentrations

处理（孢子/mL）Treatment	处理时间（d）Treatment time									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.0×10^8	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
1.0×10^7	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
1.0×10^6	b	b	c	b	b	bc	c	bc	c	c
1.0×10^5	b	b	c	c	c	c	c	c	cd	c
1.0×10^4	bc	b	c	d	d	d	d	d	de	de
对照 Control	c	b	c	d	d	d	d	d	e	e

注：同列数据不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$）。Note: Data in the same column followed by different lowercase letters represented significant difference at 0.05 level.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 球孢白僵 237 菌株对红火蚁的致死中浓度

Table 3 Lethal medium concentration of the strain to *Solenopsis invicta* 237 strain

处理天数（d） Treatment time	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数（R^2） Correlation coefficient	LC_{50}（孢子/mL） LC_{50}（spore/mL）
4	y = 13.072x − 40.788	0.9948	8.82×10^6
5	y = 16.195x − 53.417	0.9789	2.43×10^6
6	y = 17.562x − 59.247	0.9807	1.66×10^6
7	y = 18.179x − 61.799	0.9712	1.41×10^6
8	y = 18.859x − 64.99	0.9662	1.25×10^6
9	y = 19.681x − 68.471	0.9633	1.05×10^6
10	y = 20.311x − 70.888	0.9584	8.95×10^5

2.2 球孢白僵菌对红火蚁 Toll 通路免疫基因表达量的影响

荧光定量 PCR 检测结果显示，球孢白僵菌处理红火蚁后，引起了 Toll 途径免疫相关基因的表达变化。其中，Toll 途径上游 *GNBP1* 与 *Spaetzle* 基因的表达情况类似，均在 12 h 和 48 h 表达量显著高于对照，而在 24 h 和 72 h 基因表达量则受到抑制（$P < 0.01$），其中 12 h 基因的表达量最高，分别为 48 h 时基因表达量的 9.35 倍和 3.36 倍。Toll 途径中游的 *Myd88* 在处理后的第 48 h 表达量显著高于对照（$P < 0.01$），*Pelle* 在处理后 12 h 时与对照无显著差异（$P = 0.32$），其他时间均被显著抑制（$P < 0.01$）。Toll 途径下游的 *Dorsal* 和 *Defensin* 在白僵菌处理后的第 12 h 和 24 h 被显著的激活，但在 48 h 和 72 h 受到抑制（$P < 0.01$）（图 3）。

2.3 球孢白僵菌对红火蚁酶活免疫的影响

2.3.1 对红火蚁保护酶活性的影响

在球孢白僵菌处理后，与对照相比，红火蚁体内酚氧化酶（PO）在 12 h 时活性被显著抑制，而在第 24 h、48 h、72 h 则显著升高（$P < 0.01$）。过氧化物酶（POD）在处理初期的 12 h、24 h 时与对照无显著差异，在第 48 h、72 h 显著高于对照（$P < 0.01$）；超氧化物歧化酶（SOD）的活性主要在 24 h、48 h 显示较高水平，在处理 12 h 和 72 h 比无显著差异（$P < 0.01$）（图 4）。

2.3.2 对红火蚁解毒酶活性的影响

在球孢白僵菌处理后，红火蚁体内的多功能氧化酶（MFO）活性呈现波动，在处理初期第 12 h，MFO 的活性被显著的抑制（$P < 0.05$），24 h 时，MFO 的活性又显著高于对照，在处理后第 48 h，MFO 酶活性无显著差异，但在处理后的第 72 h，MFO 酶活性显著高于对照（$P < 0.01$）。谷胱甘肽-S-转移酶（GSTs）活性在 24 h、48 h 与对照相比显著积累上升，在处理初期 12 h 及后期的 72 h 比对照相比无显著差异（图 5）。

3 结论与讨论

虽然球孢白僵菌有广泛的昆虫寄主，并有一些菌株已经被研发成为生物杀虫剂，用于多种农林及卫生害虫的防治，但对于防控入侵害虫红火蚁还处于较初步的阶段，从菌株的生物测定看，一些高毒力菌株显然具有良好的防控应用潜力。我国发现红火蚁进入以后，研究人员就迅速开始探索利用白僵菌、绿僵菌进行生物防治，报道了一些室内筛选的对红火蚁高毒力菌株（杨佳后等，2009；吕利华等，2011；Li *et al.*，2016）。目前大部分研究都是在实验室进行菌株毒力测定，只有少数评估了作为红火蚁诱捕防控制剂的田间应用潜力，尚未见有商业菌剂或大面积的防治应用。筛选优良菌株和分析菌株对红火蚁作用机理是促进球孢白僵菌防治红火蚁应用的必要基础。本研究评价的球孢白僵菌 237 菌株对红火蚁具有高毒力，在 1.0×10^8 孢子/mL 浓度下对红火蚁的致死中时间为 5.288 ± 0.2014 d，第 10 天的累计死亡率可达 87% 以上，处理后第 4 ~ 10 天，致死中浓度由 8.82×10^6 孢子/mL 下降为 8.95×10^5 孢子/mL。这表明球孢白僵菌 237 对红火蚁毒力较高，是红火蚁生物杀虫剂研发的潜力资源。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

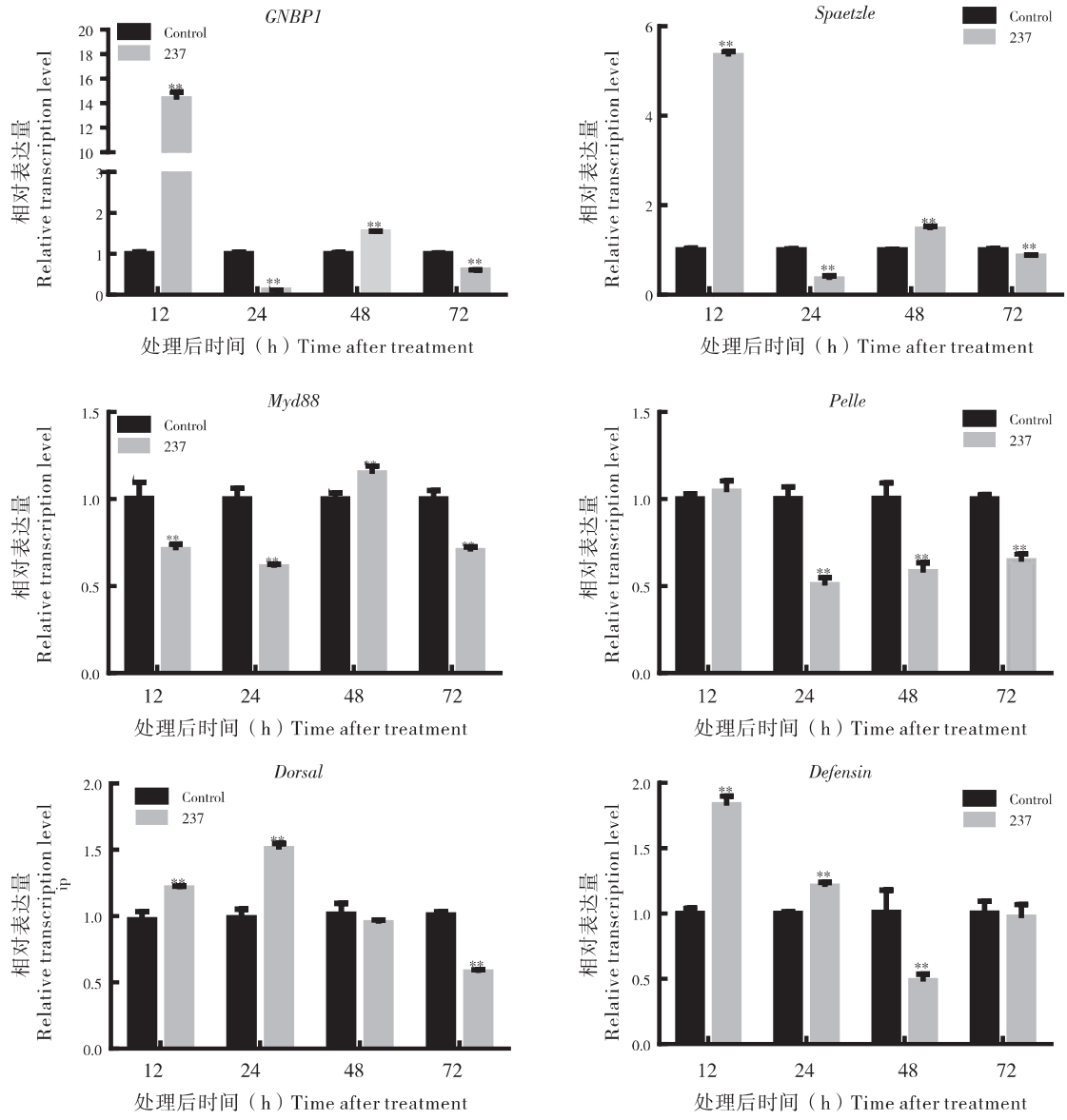


图 3　RT-qPCR 检测球孢白僵菌处理红火蚁的免疫相关基因表达量

Fig. 3　RT-qPCR detection of expression levels of immune-related genes in red fire ants treated by *Beauveria bassiana*

注：** 表示与对照差异极其显著，$P<0.01$；* 表示与对照差异显著，$P<0.05$。下图同。Note: ** meant a extremely significant difference to the control at $P<0.01$ and * meant a significant difference at $P<0.05$. Same below.

Toll 信号通路是昆虫调节免疫和发育的主要途径之一，通过识别信号因子，激活 NF-kB 转录因子，介导细胞自噬以及免疫基因的表达。在免疫过程中主要通过识别受体（GNBPs、PGPR）和 Spaetzle 的活化，膜质信号（Myd88、pelle、tube）的传导，转录因子（*Dorsal/Dif*）的激活以及抗菌肽（Defensin）的释放等过程启动免疫（Zambon *et al.*，2005；Valanne *et al.*，2011）。本研究发现，红火蚁感染球孢白僵菌后，*GNBP1* 与 *Spaetzle* 的转录水平在 12～72 h 期间呈现相似的激活－抑制－激活－抑制波动趋势；在信号向下传递过程中，*Myd88* 和 *pelle* 的表达水平总体上受到抑制，仅 *Myd88* 在 48 h 表达量显著高于对照；转录因子 *Dorsal* 和抗菌肽 *Defensin* 表达模式为在 12～24 h 被显著激活，而 48～72 h 受到抑制。说明在信号转导过程中，负责前期信号识别的受体已经被激活，并且在与白僵菌对抗中出现消长波动。类似研究结果也有报道，巴氏新小绥螨 *Neoseiulus barkeri* 在遭到球孢白僵菌感染后，*PGRP*、*Spaetzle* 在早期 2 h 就被激活，在 4～72 h 被抑制，之后 96 h 表达

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

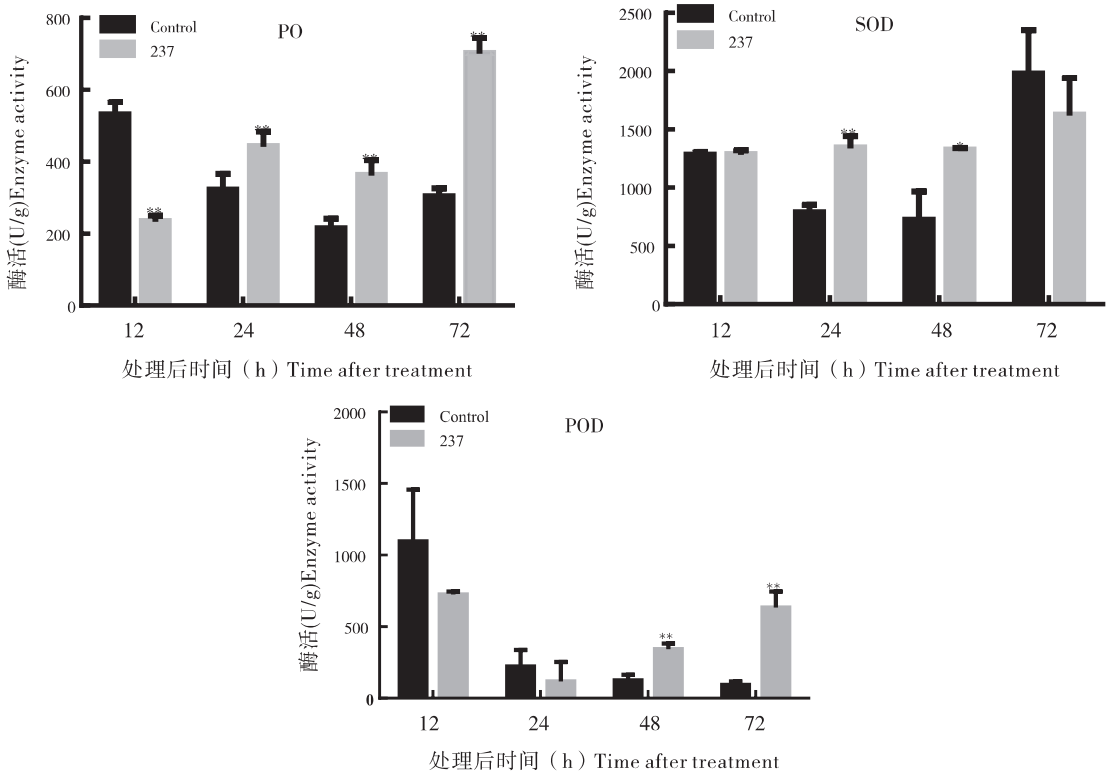


图 4　红火蚁保护酶活性比较

Fig. 4　Comparison of protective enzyme activities of *Solenopsis invicta*

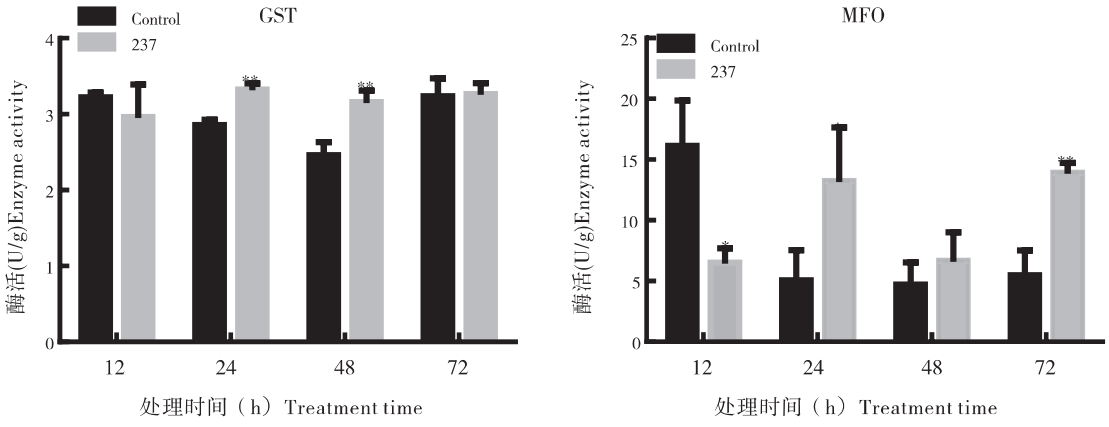


图 5　红火蚁解毒酶活性比较

Fig. 5　Comparison of detoxification enzyme activities of *Solenopsis invicta*

量又显著上升（况再银，2020）。此外，本实验中，中间信号因子（*Myd88* 和 *pelle*）受到抑制，但并未能阻断下游抗菌肽（defensin）的产生，推测红火蚁在对抗白僵菌的入侵时，除了激活 Toll 途径，还存在其他免疫调节通路共同作用。反之也说明球孢白僵菌能够成功侵染红火蚁依赖于多途径协同作用，这种入侵致病作用与红火蚁的免疫对抗机制还需要更多的研究探讨。

另一方面，昆虫体内存在保护酶系、解毒酶系，可清除或溶解体内的有毒物质，包括由病原体产生的毒蛋白或毒性小分子，以达到自我保护的目的。保护酶主要包括羧酸酯酶（CarE）、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、酚氧化酶（PO）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）等（Dubovskiy *et al.*，2008；Zou *et al.*，2017）。酚氧化酶 PO 是参与黑化反应的关键酶，在德国小蠊

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Blattella germanica 对大肠杆菌 *Escherichia coli* 的感染试验中，其活性在 12 h 之前与对照无显著差异，但 24 h 、36 h 酶活显著上升（张道伟等，2014）。本研究中，红火蚁感染白僵菌后，PO 活性出现类似反应，在第 12 h 受到抑制，而第 24 h、48 h、72 h 酶活均显著高于对照，推测在初期 12 h 内，白僵菌处于孢子萌发早期，对红火蚁还未造成威胁，因此红火蚁 PO 尚无响应或受到抑制，表现为酶活水平较低；但随着白僵菌的萌发侵入，虫体启动了免疫系统，产生保护酶反应，PO 酶活上升，黑化反应增强。此外，PO 酶活的触发也与免疫受体的识别有关。病原体中所含有的病原相关分子模式被细胞表面的免疫识别受体识别后，会引起颗粒细胞释放酚氧化酶原（proPO）激活系统的成分。通过丝氨酸蛋白酶级联反应，酚氧化酶原活化酶原被切割和修饰，从而使 proPO 活化成酚氧化酶 PO 来发挥相应的免疫功能（Söderhäll and Cerenius，1998）。在本研究中，免疫识别受体 *GNBP1* 和 *Spaetzle* 在 12 h 即被显著的激活（图 3），PO 酶活则在 24 h 后显著高于对照（图 4），且维持较高水平，推测基因转录后到蛋白功能及酶活响应需要一段过程时间，它们协同影响了虫体免疫反应。在绿僵菌和氯虫苯甲酰胺协同作用东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的研究中发现，*GNBP1*、*Toll*、*dMyD88*、*Pelle*、*PPO1* 和 *PPO2* 等基因之间的转录表达呈现正相关（贾苗，2017），也间接说明 Toll 途径基因与 PO 酶活的变化及黑化反应可能存在调控关系。SOD 和 POD 能清除超氧阴离子自由基（O^{2-}）和过氧化氢（H_2O_2），在昆虫对病原菌的抗性中起重要作用。王龙江等（2010）的研究显示，红火蚁被球孢白僵菌感染后，体内 SOD 和 CAT 的活性在 12 h 时与对照相比无显著差异，而在 24 ~ 72 h 均显著低于对照；同时 POD 表现为在处理后 36 h 出现高峰活性，随后下降。本研究中，这 2 个酶的表现有所不同，红火蚁感染球孢白僵菌后，SOD 活性在 24 h 和 48 h 呈现显著上升，之后出现下降；但 POD 在初期的 12 ~ 24 h 无显著变化，在 48 ~ 72 h 持续升高。可以推测，红火蚁多种保护酶参与了应对病原体的反应，在 24 ~ 72 h 内已启动免疫响应，不同菌株毒力的强弱差异可能导致红火蚁 SOD 和 POD 等保护酶活性的响应时间和升降幅度出现差异的原因。

昆虫解毒酶通过机体代谢产生抗性作用。混合功能氧化酶（MFO）的成分包括细胞色素和黄素蛋白等，当病原菌进入昆虫体内，昆虫体内的氧化型 P450 会与病原体释放的底物结合形成复合物，再由 NADPH 还原，最后结合并激活氧，裂解成产物并合成水，最终降解病原菌的毒性。在本研究中，MFO 酶的活性在整个检测时段出现上下波动，在 24 h 和 72 h 的活性显著高于对照。相似研究结果也有报道，东亚飞蝗感染金龟子绿僵菌后，MFO 酶的活性也呈现周期波动，在第 1 天、第 4 天受到抑制，而在第 2 ~ 3 天及第 5 天都显著上升（李贝贝等，2021）。因此，推测白僵菌的侵染过程中与寄主红火蚁的免疫发生了波动性对抗。谷胱甘肽-S-转移酶（GSTs）能够催化还原谷胱甘肽，使之与各种有害化学物质的亲电子基团结合，最终形成硫醚氨酸，促使各种毒性物质排出体外（周先碗，1999）。本研究中，红火蚁感染白僵菌后，GSTs 酶的活性在 24 h 和 48 h 出现上升，但在 72 h 酶活下降至与对照无显著差异。对比前人研究，在球孢白僵菌侵染粘虫 *Mythimna separata* 幼虫和桑天牛 *Apriona germari* 幼虫试验中也有类似的结果，虫体的谷胱甘肽-S-转移酶活力呈现先上升后下降的趋势，在处理后第 24 h 时比对照组无显著差异，但在 36 h 和 48 h 显著上升（李会平等，2009；张琛等，2020）。这说明在白僵菌侵染过程中，红火蚁受到有毒物质的胁迫，机体通过增加 GSTs 活性来加强解毒能力，以缓解毒害作用，但由于真菌的进一步侵入及营养摄取，虫体解毒系统受损，GSTs 活性最终回归或低于正常水平。病原的侵入激活昆虫免疫受体响应，引起免疫相关物质的合成或功能调节，同时引起的保护酶、解毒酶系产生反应在调节生理代谢和抗性中起重要作用。二者如何衔接和协调作用还有待深入研究和证实。

参考文献（References）

Alves SB，Stimac JL. Camargo MTV：Susceptibility of *Solenopsis invicta* Buren and s. Saevissima fr. Smith to isolated of *Beauveria bassiana*（Bals）Vuill. In：Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology［M］. California：University of California，1988.

Arthurs S，Dara SK. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States［J］. *Journal of Invertebrate Pathology*，2019，165：13 - 21.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Cao X, He Y, Hu Y, *et al.* The immune signaling pathways of *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 62: 64 – 74.

Cheng D, Zhang Z, He X, Liang G. Validation of reference genes in *Solenopsis invicta* in different developmental stages, castes and tissues [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (2): e57718.

Dubovskiy IM, Martemyanov VV, Vorontsova YL, *et al.* Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2008, 148 (1): 1 – 5.

Feng MG. Substitution probability analysis of time-dose-mortality model [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 1998, 4: 233 – 237. [冯明光. 时间 – 剂量 – 死亡率模型取代机率分析技术 [J]. 应用昆虫学报, 1998, 4: 233 – 237]

Jia M. Study On Synergistic Suppression of Migratory Locusts Immunity by *Metarhizium anisopliae* and Insecticides [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017. [贾苗. 绿僵菌和杀虫剂协同抑制飞蝗免疫研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017]

Jiang SH, Liu D, Li GJ. Occurrence, hazard and prevention of *Solenopsis invicta* Buren [J]. *Journal of Shenzhen Vocational and Technical College*, 2005, 4 (2): 4. [江世宏, 刘栋, 李广京. 入侵红火蚁 (*Solenopsis invicta* Buren) 的发生危害与防范 [J]. 深圳职业技术学院学报, 2005, 4 (2): 4]

Jouvenaz DP, Ellis EA. *Vairimorpha invictae* N. Sp. (Microspora: Microsporida), a parasite of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) 12 [J]. *The Journal of Protozoology*, 1986, 33 (4): 457 – 461.

Kuang ZY. *Neoseiulus barkeri* ′s Expression Pattern of the Toll Pathway Induced by *Beauveria bassiana* and Functional Verification of *Spz* Gene [D]. Chongqing: Southwest University Doctoral dissertation, 2020. [况再银. 球孢白僵菌诱导巴氏新小绥螨 Toll 通路的表达模式及 *Spz* 基因的功能验证 [D]. 重庆: 西南大学博士论文, 2020]

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697 – 743.

Li BB, Tian Y, Yan DZ, *et al.* Effect of serine protease inhibitor Serpin1 on enzymatic immunity of *Locusta migratoria* manilensis [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (6): 1476 – 1484. [李贝贝, 田野, 闫多子, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin1 对东亚飞蝗酶学免疫的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): 1476 – 1484]

Li HP, Huang DZ, Su XY, *et al.* Change of activity of phenoloxidase and hemocytes in *Apriona germari* larvae infected by *Beauveria bassiana* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45 (8): 4. [李会平, 黄大庄, 苏筱雨, 等. 白僵菌侵染对桑天牛幼虫酚氧化酶活性和血细胞的影响 [J]. 林业科学, 2009, 45 (8): 4]

Li J, Guo Q, Lin M, *et al.* Evaluation of a New Entomopathogenic strain of *Beauveria bassiana* and a new field delivery method against *Solenopsis invicta* [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (6): e0158325.

Li YP, Gong H. Research progress of antioxidant system in insects [J]. *Life Science*, 1998, 10 (5): 5. [李毅平, 龚和. 昆虫体内抗氧化系统研究进展 [J]. 生命科学, 1998, 10 (5): 5]

Lindsay SA, Wasserman SA. Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 42 (1): 16 – 24.

Liu XY, Lv LH, He YR. Pathogenicity of strain Bb04 of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. to red imported fire ant workers under different temperatures [J]. *Journal of Biosafety*, 2014, 23 (2): 5. [刘晓燕, 吕利华, 何余容. 不同温度下白僵菌 Bb04 菌株对红火蚁工蚁的致病力 [J]. 生物安全学报, 2014, 23 (2): 5]

Liu XY. Study on the Pathogenicity of Several Pathogenic Fungi to Red Fire Ant [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2007. [刘晓燕. 几种致病真菌对红火蚁的致病力研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2007]

Lofgren CS, Banks WA, Glancey BM. Biology and control of imported fire ants [J]. *Annual Review of Entomology*, 1975, 20: 1, 1 – 30.

Luo LZ. Considerations and suggestions on managing the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren in China [J]. *Plant Protection*, 2005, 31 (2): 5 – 8. [罗礼智. 基于控制我国红火蚁危害的几点思考 [J]. 植物保护, 2005, 31 (2): 5 – 8]

Lv LH, Liu XY, Xie MQ, *et al.* Screening of high virulence strains of parasitic red fire ant entomogenous fungi [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2011, 32 (4): 35 – 39. [吕利华, 刘晓燕, 谢梅琼, 等. 寄生红火蚁虫生真菌高致病力菌株的筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2011, 32 (4): 35 – 39]

Ministry of Agriculture (now Ministry of Agriculture and Rural Affairs), Bulletin No. 453 of the Ministry of Agriculture of the People′s Republic of China [EB/OL]. 17 January 2005, http://www.moa.gov.cn/ztzl/zwjy_1/200504/t20050418_357929.htm. [农业部 (现农业农村部), 中华人民共和国农业部公告第 453 号 [EB/OL]. 2005 年 1 月 17 日, http://www.moa.gov.cn/ztzl/zwjy_1/200504/t20050418_357929.htm]

Perinotto WM, Angelo IC, Golo PS, *et al.* Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi [J]. *Experimental Parasitology*, 2012, 130 (3): 257 – 260.

Rosales C. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. In: Shields, VD, editor. Insect Physiology and Ecology (Internet) [M]. London: IntechOpen, 2017.

Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase – activating system in invertebrate immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998: 23 – 28.

Valanne S, Wang JH, Ramet M. The *Drosophila* Toll signaling pathway [J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186 (2): 649 – 656.

Vinson SB, Mackay WP. Effects of the fire ant, *Solenopsis invicta*, on electrical circuits and equipment [J]. *Applied Myrmecology*, 1990: 8.

Wang LJ, Lv LH, Xie MQ, *et al.* Changes of activities of protective enzyme and detoxification enzyme in *Solenopsis invicta* Buren

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

infected by *Beauveria bassiana* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29 (3): 282 – 286. [王龙江, 吕利华, 谢梅琼, 等. 红火蚁感染白僵菌后体内保护酶和酯酶活性的变化 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29 (3): 282 – 286]

Wu ZP, Tong YH. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to red fire ant workers [J]. *Journal of Forest and Environment*, 2020, 40 (1): 7. [吴志鹏, 童应华. 球孢白僵菌和金龟子绿僵菌对红火蚁工蚁的致病力测定 [J]. 森林与环境学报, 2020, 40 (1): 7]

Yang JH, Sun FF, Liao KH, *et al*. Bioassay of virulence of four strains of *Beauveria bassiana* to red fire ant [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2009, 31 (1): 46 – 51. [杨佳后, 孙钒, 廖坤宏, 等. 4 株球孢白僵菌对红火蚁毒力的生物测定 [J]. 环境昆虫学报, 2009, 31 (1): 46 – 51]

Yang S, Huang FS. Advances in molecular mechanisms of melanism in insects [J]. *International Journal of Parasitic Diseases*, 2003, 30 (4): 164 – 168. [杨松, 黄复生. 昆虫黑化反应的分子机制研究进展 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2003, 30 (4): 164 – 168]

Yang XF, Zhou XX, Zheng XL. Research progress of fungus – induced insect immune response [J]. *Journal of Guizhou Agricultural Sciences*, 2008, 36 (5): 4. [杨晓峰, 周小霞, 郑小莉. 真菌诱导的昆虫免疫反应研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2008, 36 (5): 4]

Zambon RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP. The Toll pathway is important for an antiviral response in Drosophila [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 102 (20): 7257 – 7262.

Zeng L, Lu YY, He XF, *et al*. Identification and damage investigation of red fire ants invading China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2005, 42 (2): 144 – 148. [曾玲, 陆永跃, 何晓芳, 等. 入侵中国大陆的红火蚁的鉴定及发生为害调查 [J]. 应用昆虫学报, 2005, 42 (2): 144 – 148.

Zhang C, Chen SB, Wu CY, *et al*. Screening of *Beauveria bassiana* strains with high virulence against armyworm and activities of protective enzymes in the larvae infected by fungi [J]. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2020, 34 (12): 7. [张琛, 陈思博, 吴晨源, 等. 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 [J]. 核农学报, 2020, 34 (12): 7]

Zhang DW, Chen J. Role of phenol oxidase in immune response of *Blattella Germanica* to *Escherichia coli* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (10): 10. [张道伟, 陈静. 酚氧化酶参与德国小蠊对大肠杆菌的免疫应答 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (10): 10]

Zhou C, Yang H, Wang Z, *et al*. Protective and detoxifying enzyme activity and ABCG Subfamily gene expression in *Sogatella furcifera* under insecticide stress [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1890.

Zhou XY. A new method for isolation and purification of insect glutathione S-transferase [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15 (2): 269 – 273. [周先碗. 昆虫谷胱甘肽 S – 转移酶分离纯化的新方法 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (2): 269 – 273]

Zou C, Lv C, Wang Y, *et al*. Larvicidal activity and insecticidal mechanism of *Chelidonium majus* on *Lymantria dispar* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 142: 123 – 132.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net