

一种体外分析亚洲玉米螟幼虫血细胞包囊的改进方法

赵华福^{1, **}, 刘佳^{1, 2, **}, 胡建^{1, *}

(1. 中山大学 生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨, 150030)

摘要: 包囊反应是昆虫清除侵入体内的外源物如病原体 and 寄生生物的一种非常重要的细胞免疫反应。由于受到不便于观察、操作复杂等问题的限制, 很多包囊分析实验无法或难于在昆虫体内完成。体外包囊方法在一定程度上解决了这些问题。目前常用的体外包囊是在 96 孔板中加入昆虫血细胞和外源物, 如凝胶珠进行培养观察, 但这种方法存在着一些明显的缺陷。本文以亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 幼虫血细胞为研究对象, 使用 0.2mL 的离心管 (Eppendorf tube) 代替 96 孔板, 并将其固定在匀速旋转的载体上培养, 极大程度的模拟了反应物在昆虫体内的状态。结果表明, 改进方法后昆虫血细胞的体外包囊效果得到明显提高, 且血细胞的状态也得到明显改善; 而添加抗凝剂会减弱血细胞对外源物的包囊能力。

关键词: 亚洲玉米螟; 血细胞; 包囊; 96 孔板; 离心管; 抗凝剂

中图分类号: Q969.432 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853- (2007) 06-0675-06

An Improved Method on Encapsulation Assays by Larval Hemocytes from *Ostrinia furnacalis* *in vitro*

ZHAO Hua-fu¹, LIU Jia^{1, 2}, HU Jian^{1, *}

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510275, China;

2. Collage of Agriculture, North East Agricultural University, Harbin, 150030, China)

Abstract: Encapsulation, a kind of cellular immune reaction of insect, plays an important role in eliminating foreign objects such as pathogens and parasites which invade insect hemocoels. As a result of limited observation and complicated manipulations, analysis of encapsulation can not be easily performed *in vivo*. Encapsulation *in vitro* resolves these problems to a certain extent. Now, encapsulation assays *in vitro* are usually performed in 96-well plates in which foreign objects such as sephadex beads and insect hemocytes are contained and observed, but some shortcomings exist in this method. In this paper, an improved analysis method on the encapsulation of *Ostrinia furnacalis* larvae hemocytes *in vitro* is introduced. 0.2 mL Eppendorf tubes are the substitute for the 96-well plates and they are fixed to a revolving rotator at a speed of 4 circles per min. The states of hemocytes and sephadex beads in insect's hemocoels are replicated under this method. Results showed that the states of hemocytes were improved and encapsulation was enhanced under the new method and anticoagulants might inhibit the encapsulation ability of hemocytes.

Key words: Insect hemocytes; Encapsulation; 96-well plate; Eppendorf tube; Anticoagulant

昆虫在短暂的生命活动中要面临着多种病原微生物、寄生物的威胁, 但昆虫是地球上数量最多、分布范围最广泛的动物群体, 这与它们极其有效的免疫能力是分不开的。昆虫虽然不具有哺乳动物所特有的特异性免疫能力, 但其天然免疫系统可以提供非常有效的保护。昆虫的天然免疫系统被人为分为体液免疫和细胞免疫, 其中体液免疫反应包括抗

菌肽及氮和氧的活性中间产物的产生 (Bogdan et al, 2000), 以及调控血淋巴凝集和黑化的酶联反应 (Muta & Iwanaga, 1996; Gillespie et al, 1997); 细胞免疫反应则指血细胞介导的免疫反应, 如吞噬、结节和包囊 (Strand & Pech, 1995; Schmidt et al, 2001)。虽然这二者的作用并不是截然分开的, 很多免疫反应是由二者共同参与完成的, 但对于大

收稿日期: 2007-09-12; 接受日期: 2007-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500059); 有害生物控制及资源利用国家重点实验室开放课题 (2003-02 和 2003-06)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lsshj@mail.sysu.edu.cn

** 并列第一作者和单位。作者简介: 赵华福 (1982-), 男, 广西人, 硕士研究生; 刘佳 (1982-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生。

量入侵的病原微生物,包囊反应则是一种非常有效的保护,它可以在短时间内迅速清除绝大多数的病菌,保障昆虫正常生长;同时,对于个体相对较大的寄生物如寄生蜂卵等,包囊反应也是唯一有效的清除手段。因此,包囊反应在昆虫的细胞免疫反应中占有绝对重要的位置,对昆虫细胞免疫反应的研究必定要进行包囊分析。目前国内外对昆虫体液免疫反应的研究比较深入,而昆虫细胞免疫反应的研究则相对落后,这与昆虫个体小,难操作,且没有一种完善的血细胞包囊分析方法是有很大大关系的。

目前对昆虫血细胞进行包囊分析的方法主要分为体内包囊和体外包囊两种。体内包囊指先将凝胶珠、尼龙绳或异体组织等较大的外源物注(植)入昆虫体内,一段时间后再从虫体内将注(植)入物解剖出来观察包囊情况(Richards & Edwards, 2002; Faraldo & Lello, 2003)。体内包囊分析的优点是可以如实地反应昆虫体内包囊的真实状况,外源物的包囊效果好;但是也存在明显的缺点,如:包囊过程无法观测,而且不便于操作,尤其是研究单一血细胞粒细胞或浆细胞在包囊反应过程中的作用时,通过体内包囊无法进行研究。因此,目前绝大多数对包囊反应的研究都采用体外包囊的方法。体外包囊主要采用96孔板法,即将昆虫血细胞和外源物同时加到铺有琼脂糖的96孔板中,在适合的环境条件下进行培养,然后在倒置显微镜下观察(Pech et al, 1994; Pech & Strand, 1996; Lavine & Strand, 2001)。该方法在一定程度上克服了体内包囊所存在的问题,便于随时观察包囊进程,操作比较简单。但也存在较大缺陷:由于血细胞极易与孔板壁黏附,极大地减少了参与包囊的血细胞数量,进而影响包囊效果。为了避免上述情况,通常都在孔板底部铺上一层琼脂糖,但琼脂糖凝固后会形成凹面,导致凝胶珠聚集在凹面的底部中央,很难与血细胞充分接触。此外,昆虫血细胞和珠子处于静止状态,与在昆虫体内的循环状态差别较大。这些都在一定程度上影响了包囊效果,不能如实地反映昆虫血细胞的包囊情况。所以,探索出一套更加完善有效的体外包囊方法进行昆虫细胞免疫反应研究是非常必要的。

针对以上问题,本研究以亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)五龄第3天幼虫的血细胞和葡聚糖凝胶珠Sephadex A-25为研究对象,对包囊反应的方法进行了改进,现将其结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫及饲养

将亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)幼虫置于(25±1)℃,相对湿度>70%和光周期16L:8D的温室条件下,依Zhou et al(1979)方法,采用半人工饲料饲养。根据其头壳宽度和蜕皮次数来鉴别龄期。

1.2 血细胞的收集和分析

用解剖剪剪去亚洲玉米螟五龄第3天幼虫的第二腹足,将血淋巴液滴于Parafilm膜上,用移液器迅速将其移入装有1 mL预冷的生理盐水(Pringle's Saline: 1.541 mol/L NaCl, 0.027 mol/L KCl, 0.14 mol/L CaCl₂, 0.222 mol/L 葡萄糖)或抗凝剂(0.098 mol/L NaOH, 0.186 mol/L NaCl, 0.017 mol/L EDTA, 0.041 mol/L 柠檬酸, pH 4.5)的离心管中,4℃下500 g离心5 min。弃上清液,再加入1 mL Pringle's Saline重悬。重复离心后用适量Pringle's Saline重悬待用。同时,每次取部分细胞悬液,使用血球记数板计算血细胞密度。

1.3 体外包囊方法

1.3.1 96孔板法 无菌条件下在96孔板每孔中加入1%琼脂糖70 μL,待其凝固后加入一定密度的血细胞50 μL和20~60个葡聚糖凝胶珠Sephadex A-25。将孔板用Parafilm膜密封好后置于26℃室温下培养,每隔规定时间在相差显微镜下观察包囊情况,或用移液器取出部分孔内的珠子统计包囊结果。

1.3.2 离心管法 无菌条件下取一定密度的50 μL血细胞滴于0.2 mL离心管中部使其形成悬滴,并加入20~60个葡聚糖凝胶珠Sephadex A-25于悬液中央。然后将离心管固定于匀速旋转(约4r/min)的台式风扇的导风轮上,离心管口部朝上,尾部指向风扇轴心。置于26℃室温下,每隔规定时间用移液器取出部分离心管内的珠子观察统计包囊结果。

1.4 体外包囊程度的划分

根据包囊的厚度对包囊程度进行划分,每一类分别用渐次增加的数字代表:0表示没有血细胞黏附或只有数个血细胞黏附;1表示包囊厚度小于凝胶珠半径的1/2;2表示包囊厚度大于凝胶珠半径的1/2,小于半径;3表示包囊厚度大于凝胶珠半径。同样,根据包囊的面积对包囊程度也进行划分,每一类分别用渐次增加的数字代表:0表示没有血细

胞黏附或只有数个血细胞黏附；1表示包裹面积小于凝胶珠表面的1/3；2表示包裹面积大于凝胶珠表面的1/3。对每一时间点不同程度的包裹分别进行加权，然后用它们的加权和代表在这一时间点时包裹的总体情况，即包裹程度。计算方法为：包裹程度 $=\sum(P \times T + P \times A)$ ，其中 P 代表每一类珠子占总珠子的百分比， T 代表包裹厚度的数字类别（即0, 1, 2, 3）， A 代表包裹面积的数字类别（即0, 1, 2）。

每一时间点的包裹比率为被包裹珠子占总珠子的比例。厚度大于凝胶珠半径的1/2，且面积大于凝胶珠面积的1/3的包裹看作为已包裹，其他为未包裹。

1.5 数据分析方法

为了避免昆虫血细胞在大密度条件下出现聚集，通常在收集血细胞时会使用抗凝剂。但是由于包裹反应的过程要求血细胞具有良好的聚集能力，因此是否抗凝剂处理后的血细胞可以用来进行包裹分析，目前还未见报道。我们比较了在收集血细胞时分别使用抗凝剂和Pringle's Saline两种不同缓冲液条件下， $1 \times 10^7 \text{ cell/mL}$ 的血细胞对Sephadex A-25在2h后的包裹情况，并对同一细胞密度时的两种处理的包裹百分比和包裹程度进行差异显著性分析。平均值的差异显著性分析方法采用独立样本 t 检验（ t -test）。

2 结果与分析

2.1 96孔板法和离心管法进行体外包囊的比较

包裹反应是由血细胞完成的，因此昆虫血细胞的状态会对包裹反应的程度产生极大影响。在血细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ cell/mL}$ ，Pringle's saline处理血淋巴，包裹时间为2 h的条件下，在96孔板中的血细胞状态较差，部分血细胞死亡，且分泌出絮状内含物；而在离心管中的血细胞则呈现正常状态，极少细胞死亡（图1）。

不同的血细胞密度条件下，血细胞对Sephadex A-25形成的包裹的包裹比率和包裹程度会存在较大的差别，因此我们对比了在不同细胞密度条件下，两种实验方法中Sephadex A-25的包裹率和包裹程度，并对其进行了差异显著性检验（ t -test）分析（ $n=3$ ）。当细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ cell/mL}$ 时，在包裹反应开始30 min后，离心管法和96孔板法的包裹率分别为54.3%和39.3%，两者的包裹率和包裹程度差异均不显著（ t -test, $P > 0.05$ ）。包裹2 h后，离心管法的包裹率达到了84.8%，而96孔板法的包裹率仅为50.5%。经 t 检验分析，离心管法的包裹率和包裹程度远大于96孔板法，达到差异极显著水平（ $P < 0.01$ ）。在包裹24 h后，离心管法的包裹率与96孔板法差异虽不显著（ $P > 0.05$ ），但其包裹程度与96孔板法达到差异显著水平（ $P < 0.05$ ）（图2）。

在包裹初期，主要是包裹的启动期，此时血细胞与板（管）壁黏附的很少，状态与在体内时非常接近。此外，血细胞密度较大，无论在什么条件下血细胞与Sephadex A-25的接触机会都很大，包裹情况不会受到明显影响。但随着包裹时间的延长，由

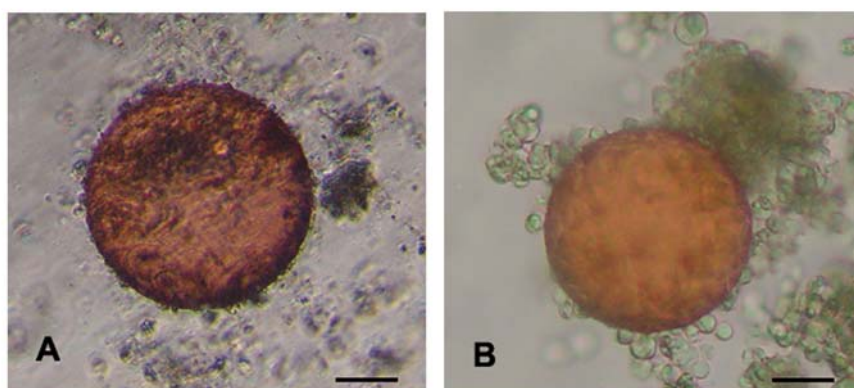


图 1 亚洲玉米螟幼虫血细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ cell/mL}$ 时，96孔板法（A）与EP管法（B）包裹Sephadex A-25 2h 后血细胞的状态（标尺=50 μm ）

Fig. 1 The states of hemocytes under two kinds of methods after 2h of encapsulation in the density of hemocytes for encapsulation is $1 \times 10^7 \text{ cell/mL}$ (Scale bars =50 μm)

A: Encapsulation of sephadex A-25 beads by hemocytes of *Ostrinia furnacalis* with 96-well plate method;

B: Encapsulation of sephadex A-25 beads by hemocytes of *Ostrinia furnacalis* with Eppendorf tube method.

于重力的影响,血细胞会明显聚集在96孔板底部,虽然96孔板中铺有琼脂糖,但还是会有一定程度的黏附。此外,血细胞对孔侧壁也会有较明显的黏附,由于黏附后的血细胞会释放一定的因子,对没有黏附的血细胞的状态产生较大影响。而离心管中生理盐水是以悬滴的形式存在的,最大程度减小了血细胞与管壁的接触,因此与管壁黏附的血细胞数量较少。此外,随离心管不停地旋转,液滴内的血细胞也随之运动,基本呈均匀分布,因此不会造成聚集,明显减少了血细胞间的非包囊聚集,因而对游离的血细胞的状态影响就小。随着形成包囊的血细胞数量的增多,游离在生理盐水中的血细胞的数量逐步减少,此时,血细胞与Sephadex A-25接触的机会多少会明显影响包囊的程度。因此,离心管中的血细胞由于状态好,数量多,包囊能力必然强于96孔板中的血细胞。当包囊进行到一定程度后,处于游离状态的血细胞的数量大大减少,此时,血细胞与Sephadex A-25的接触机会明显减少,能形成包囊的就更少,因此包囊程度不会产生明显的变化。

因为亚洲玉米螟体内血细胞密度约为 $1\sim 4\times 10^7\text{cell/mL}$ (Hu et al, 2003),当血细胞密度为 $1\times 10^6\text{cell/mL}$ 时,其密度远低于自然水平,无论在什么条件下,血细胞形成包囊的程度和比率都较

低。因此两种方法下的结果差异不显著(图2)。但在这个细胞密度下,包囊能力弱不是由于血细胞没有包囊能力,而是由于血细胞的数量少导致不能形成包囊。所以, $1\times 10^6\text{cell/mL}$ 的实验条件用来分析血细胞的包囊是不合适的。

2.2 抗凝剂和生理盐水处理后(离心管法)血细胞的体外包囊效果比较

比较使用抗凝剂和Pringle's saline两种不同缓冲液条件下, $1\times 10^7\text{cell/mL}$ 的血细胞对Sephadex A-25在2h后的包囊情况,并对同一细胞密度时的两种处理的包囊百分比和包囊程度进行差异显著性分析(*t*-test, $n=3$)后的结果表明,血细胞在用抗凝剂处理后,包囊百分比和包囊程度都远远小于Pringle's saline处理的血细胞($P<0.01$)。抗凝剂对血淋巴的处理显著影响了血细胞的包囊状态。因此,用于包囊分析的昆虫血细胞在收集时不能使用抗凝剂(图3)。

3 讨论

3.1 离心管法的优点

与传统的使用96孔板进行的体外包囊实验相比较,本文中描述的离心管包囊法的优点在于:(1)细胞悬液在离心管内形成悬滴,细胞分布均匀,极

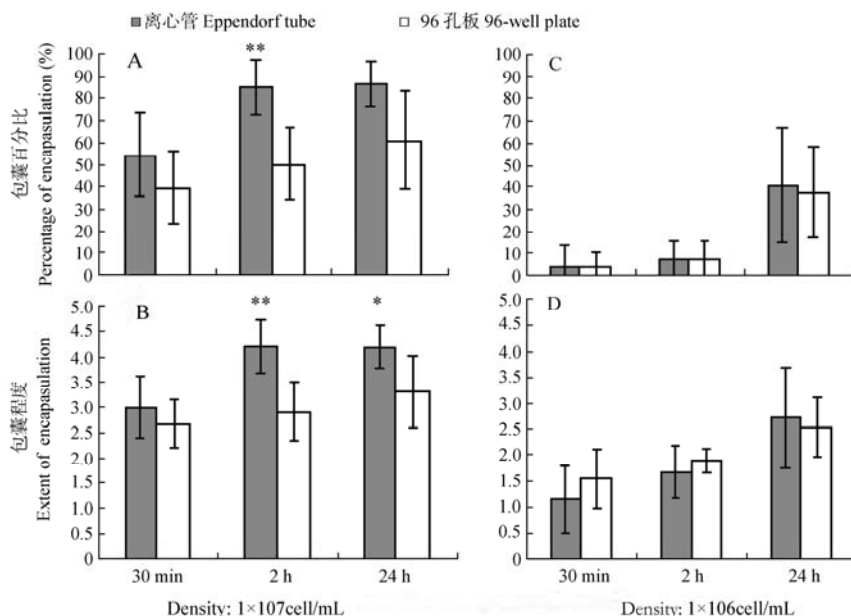


图2 采用离心管和96孔板法,亚洲玉米螟五龄幼虫血细胞包囊Sephadex A-25的情况
Fig. 2 Encapsulation of Sephadex A-25 beads with Eppendorf tube method or 96-well plate method

A, C: 包囊百分比(Show the rate of encapsulation); B, D: 包囊程度(Show the extent of encapsulation).

* $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$.

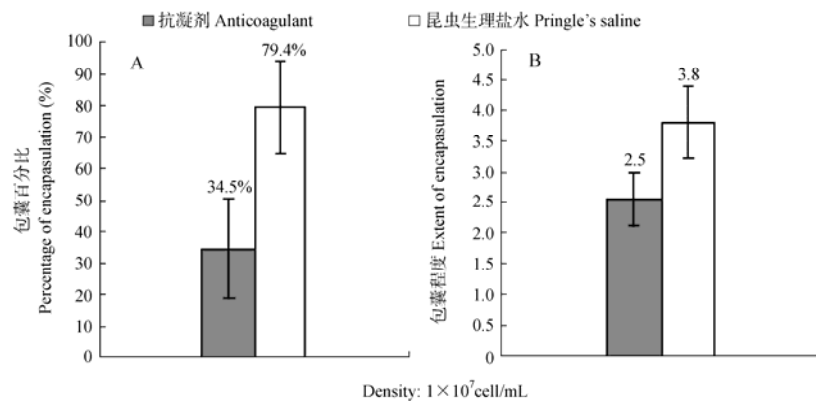


图 3 抗凝剂和Pringle's saline处理的血细胞包裹Sephadex A-25 2 h的效果比较

Fig. 3 Encapsulation of Sephadex A-25 beads with hemocytes treated with anticoagulant or Pringle's saline

** $P < 0.01$.

大的减少了血细胞黏附到离心管壁的概率；（2）离心管时刻处于旋转状态，使得凝胶珠保持运动状态，能和细胞较为充分地接触，这在很大程度上模拟了血细胞的体内流动状态；（3）操作方便，不必加琼脂糖铺板，同时避免了琼脂糖对细胞的影响；（4）不需要倒置显微镜，在普通光学显微镜下就可以完成实验。

3.2 体外包裹程度的划分

外源物表面电荷特征差异，血细胞的状态差异，包裹时间的长短等等都会影响包裹程度。Hu等（2003）对亚洲玉米螟血细胞体内包裹葡聚糖凝胶珠 Sephadex A-25 的包裹程度进行了系统的划分。但是由于昆虫体内血细胞是循环流动的，“非我”外源物在寄主体内能与血细胞充分接触，此外，昆虫体内血细胞是不断再生的，体内血细胞密度能维持在一个稳定的水平，因此形成的包裹是全面而厚实的，可将外源物完全包裹，对这种包裹的程度可以根据其厚度进行评估。而在体外的包裹反应中，离心管法只能最大程度的模拟体内环境，使血细胞和凝胶珠保持一定的运动状态。但是当一部分血细胞黏附到外源物表面形成包裹后，离心管中血细胞的密度就会大大降低，因此形成的包裹还是不能在昆虫体内形成的包裹完全一致，包裹的厚度是不同的。只有珠子的部分外表面能形成较厚的包裹，有些部位甚至不会被包裹，因此体外包裹程度的划分则较为复杂。目前国内外对体外包裹也无明确的划分，只是大致将包裹分别未包裹和已包裹（Pech & Strand, 1996; Ling & Yu, 2005; Richards & Edwards, 2002）。本文在已有的体内包裹分级标准（Hu et al, 2003）的基础上，根据包裹厚度和

面积的不同，用不同程度的包裹所占的百分率的加权和来评估体外包裹程度，这样在一定程度上可以减小误差，更加准确地反映体外血细胞包裹的实际情况。

3.3 血细胞密度及包裹时间的优化

在比较这两种包裹方法的预实验中，我们分别选择了 $1 \times 10^7 \text{cell/mL}$ 、 $1 \times 10^6 \text{cell/mL}$ 和 $1 \times 10^5 \text{cell/mL}$ 三个不同的细胞密度，发现细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{cell/mL}$ 时，血细胞不包裹凝胶珠（数据未示），推测是因为密度值远小于昆虫体内天然血细胞密度（约 $1 \times 10^7 \text{cell/mL}$ - $4 \times 10^7 \text{cell/mL}$ ），无法达到产生包裹的下限；而细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{cell/mL}$ 时，两种包裹方法的包裹效果差别不大（图 2），可能也是因为细胞密度影响了包裹效果，包裹方法不是影响包裹的主要原因；当细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{cell/mL}$ 时，这时细胞密度接近昆虫体内天然血细胞密度，包裹率和包裹程度达到一个较高的水平，不同包裹方法就显著影响了包裹的效果。

我们在预实验中对包裹时间选择了 10 min、30 min、2 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h，发现包裹 10 min 和 30 min 无明显区别，包裹程度较轻；而 2 h 后包裹程度达到一个较高的水平。然后从 2 h 到 24 h 包裹程度的变化极小，差异不显著；而 24 h 后包裹程度无明显变化（数据未示）。所以我们在后面的实验中选择了 $1 \times 10^7 \text{cell/mL}$ 和 $1 \times 10^6 \text{cell/mL}$ 的细胞密度及 30 min、2 h 和 24 h 的包裹时间。

3.4 不同缓冲液对血细胞的影响

在哺乳动物中，凝血过程的三个阶段都有 Ca^{2+} 的参与。而抗凝剂可以阻止血细胞的凝集，是因为抗凝剂中含有柠檬酸钠和乙二胺四乙酸（EDTA），

柠檬酸钠可与 Ca^{2+} 结合成络合物柠檬酸钠钙, EDTA 可以螯合钙, 所以除去血浆中的 Ca^{2+} 即可以达到抗凝的目的。研究表明, Ca^{2+} 能对烟草天蛾的浆细胞的黏附性产生影响, 用 EDTA 能螯合 Ca^{2+} 后, 浆细胞的黏附会被抑制, 而提高 Ca^{2+} 浓度则会使浆细胞更快的黏附和延展 (Willott et al, 2002)。

传统的收集血细胞的方法使用了抗凝剂, 虽然在收集血细胞的后几步把抗凝剂去掉了, 但这时 Ca^{2+} 的浓度可能已大大降低, 所以昆虫血细胞的黏附性可能已受到了影响, 或血细胞要恢复原先的强黏附性还需要一段时间, 这些都有可能導致包囊效果的削弱。

参考文献:

- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity [J]. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 64-76.
- Faraldo AC, Lello E. 2003. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes [J]. *Biocell*, **27** (2): 197-203.
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity [J]. *Annu Rev Entomol.* **42**: 611-643.
- Hu J, Zhu XX, Fu WJ. 2003. Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenee (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *J Insect Physiol.* **49** (4): 367-375.
- Lavine MD, Strand MR. 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens* [J]. *J Insect Physiol.* **47** (9): 965-974.
- Ling E, Yu XQ. 2005. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol.* **30** (3): 289-299.
- Muta T, Iwanaga S, 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity [J]. *Curr Opin. Immunol.* **8**: 41-47.
- Pech LL, Strand MR. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes [J]. *J Cell Sci.* **109** (Pt 8): 2053-2060.
- Pech LL, Trudeau D, Strand MR. 1994. Separation and behavior *in vitro* of hemocytes from the moth, *Pseudoplusia includens* [J]. *Cell Tissue Res.* **277** (1): 159-167.
- Richards EH, Edwards JP. 2002. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, disrupts the cytoskeleton of host haemocytes and suppresses encapsulation *in vivo* [J]. *Arch Insect Biochem Physiol.* **49** (2): 108-124.
- Schmidt O, Theopold U, Strand M. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids [J]. *Bioessays.* **23** (4): 344-351.
- Strand MR, Pech LL. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships [J]. *Annu Rev Entomol.* **40**: 31-56.
- Willott E, Hallberg CA, Tran HQ. 2002. Influence of calcium on *Manduca sexta* plasmatocyte spreading and network formation [J]. *Arch Insect Biochem Physiol.* **49** (4): 187-20.
- Zhou DR, Wang YY, Liu BL, Ju ZL. 1979. Studies on the Mass Rearing of Corn Borer I. Development of a Satisfactory Artificial Diet for Larva Grows [J]. *Journal of Plant Protection.* **7**: 113-122. [周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 剧正理. 1979. 玉米螟的大量繁殖研究 I: 一种半人工饲料的改进. 植物保护学报, 7: 113-122.]