

橘小实蝇雌虫对其肠道共生菌发酵液的嗅觉行为反应

林嘉¹, 蔡普默^{1,3}, 张贺贺¹, 宋学森¹, 张琪文¹, 仪传冬¹, 敖国富^{1,4}, 杨建全^{1*}, 季清娥^{1,2*}

(1. 福建农林大学益虫研究所/联合国(中国)实蝇防控研究中心/闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室/生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002; 2. 福建农林大学作物生物技术福建省高校重点实验室, 福州 350002; 3. 武夷学院茶与食品学院, 武夷山 354300; 4. 安顺学院农学院, 安顺 561000)

摘要: 肠道微生物潜在的生物防治价值为研究橘小实蝇治理提供了一个新的思路。本研究利用 Y 型嗅觉仪测试了橘小实蝇肠道菌发酵原液及其高压灭活上清液对寄主雌虫在 10、20 以及 30 min 嗅觉行为的影响, 结果表明阴沟肠杆菌 (F8)、肠杆菌属 (F13)、产气克雷伯氏菌 (F26)、霍氏肠杆菌 (F67) 发酵原液以及阴沟肠杆菌 (F8)、肺炎克雷伯氏菌 (F10)、*Pseudocitrobacter anthropi* (F16)、粪肠球菌 (F18)、赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)、蜡样芽胞杆菌 (F45)、铜绿假单胞菌 (F50)、阴沟肠杆菌 (F59) 高压灭活上清液对橘小实蝇雌虫具有显著的引诱效果, *P. anthropi* (F16) 发酵原液对雌虫具有显著的忌避作用; 此外, 橘小实蝇对不同的肠道菌的反应时间不同。本研究明确了橘小实蝇雌虫对其肠道菌发酵原液、高压灭活上清液的嗅觉反应, 为开发雌虫引诱或忌避剂提供了依据。

关键词: 橘小实蝇; 雌虫; 肠道菌; 嗅觉行为

中图分类号: S436.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2019)06-0891-09

The Olfactory Behavioral Response of *Bactrocera dorsalis* Females to Fermented Solution of Their Gut Endosymbionts

LIN Jia¹, CAI Pumo^{1,3}, ZHANG Hehe¹, SONG Xuesen¹, ZHANG Qiwen¹, YI Chuandong¹,
AO Guofu^{1,4}, YANG Jianquan^{1*}, JI Qing'e^{1,2*}

(1. Institute of Beneficial Insects, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University/UN (China) Center for Fruit Fly Prevention and Treatment/State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops/Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Crop Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Department of Horticulture, College of Tea and Food Science, Wuyi University, Wuyishan 354300, China; 4. College of Agriculture, Anshun University, Anshun 561000, China)

Abstract: The biocontrol potential value of gut bacteria provides a new insight for the control of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). In this study, Y-tube olfactometer was used to investigate the effects of the fermented solution and autoclaved supernatant of gut endosymbionts on the olfactory responses of their host, female *B. dorsalis*, within 10, 20 and 30 mins. The results showed that the fermented solution of *Enterobacter cloacae* (F8), *Enterobacter* sp. (F13), *Klebsiella aerogenes* (F26), and *E. hormaechei* (F67), and the autoclaved supernatant of *E. cloacae* (F8), *K. pneumoniae* (F10), *Pseudocitrobacter anthropi* (F16), *Enterococcus faecalis* (F18), *Atlantibacter hermannii* (F31), *Bacillus cereus* (F45), *Pseudomonas aeruginosa* (F50), and *E. cloacae* (F59) exhibited significant attraction to *B. dorsalis* females. Greater repellent effect was observed in the fermented solution of *P. anthropi* (F16). Furthermore,

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0202000)

作者简介: 林嘉, 硕士研究生, E-mail: Linjia25@foxmail.com; *通信作者, 杨建全, 博士, 研究员, E-mail: jqyang2003@163.com; 季清娥, 博士, 研究员, E-mail: Jiqinge@yeah.net。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.007

B. dorsalis showed varied responding time to different bacteria species. The olfactory responses of female *B. dorsalis* to their intestinal tract bacteria identified in the paper will provide the theoretical basis for exploiting new attractive lure or repellent against female *B. dorsalis*.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; female; gut bacteria; olfactory behavioral response

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel 是一种毁灭性害虫, 具极强的入侵扩散能力和对环境的适应能力, 广泛分布于东南亚及太平洋地区, 为害 350 多种蔬菜和水果, 包括芒果、柑橘、番石榴、香蕉、橘子、辣椒、番茄等常见果蔬植物的果实^[1]。橘小实蝇成虫将卵产于果内, 幼虫孵化后群集于果肉内潜食, 致使果实腐烂脱落^[2], 严重影响果蔬产量与质量, 给农业经济带来不可估量的损失, 并对食品安全造成巨大威胁。化学防治以及灭雄技术是田间防治橘小实蝇的主要手段, 但已有研究表明, 田间橘小实蝇种群对常用杀虫剂的抗药性已日渐增强^[3], 而在灭雄技术中大量使用的甲基丁香酚 (Methyl eugenol, 简称 ME) 近年来被发现能增强雄虫的交配能力^[4]。此外, ME 仅能诱集橘小实蝇雄虫, 对雌虫无引诱效果, 而雌虫是控制橘小实蝇繁殖和为害的主要切入点。因此, 研究对雌虫有引诱或趋避作用的新型物质成为目前研究橘小实蝇防控技术的重要思路。

实蝇肠道共生菌在实蝇生长发育、营养代谢、生殖免疫以及生物防治等方面都发挥着巨大作用^[5], 它们可以参加实蝇的氮素循环, 为实蝇提供食物中所欠缺的营养物质, 如氨基酸等^[6], 还能帮助实蝇降解农药^[7], 缩短发育历期^[8], 提高存活率^[9,10], 抑制条件致病菌的增殖^[11], 提高雌虫产卵量^[12], 并影响着不育雄虫的质量^[13]。最近研究表明, 肠道微生物能够引起实蝇的嗅觉行为反应^[14,15], 并能抑制实蝇的产卵行为^[16], 这无疑为田间防治橘小实蝇提供了一个新思路。因此本研究利用 Y 型嗅觉仪测试了橘小实蝇雌虫对其肠道菌的发酵原液及其高压灭活上清液的嗅觉行为反应, 以期明确对雌虫具引诱或忌避作用的肠道微生物, 为研发新型雌虫引诱或忌避剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试橘小实蝇来自福建农林大学益虫所。将羽化的橘小实蝇饲养于养虫笼 (30 cm×30 cm×30 cm) 内, 期间提供饲料 (酵母:糖=1:3) 和水。饲养条件: 温度 (25±1) °C, 相对湿度 RH (65±5) %, 光周期 14L:10D。取羽化 13~15 d 的橘小实蝇饥饿 24 h 后用于试验。

1.2 供试肠道菌

肠杆菌属 *Enterobacter* sp. (F3) (MK559548), 阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* (F8) (MK559552), 肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumonia* (F10) (MK559550), *Clostridium intestinale* (F11) (MK559547), 肠杆菌属 *Enterobacter* sp. (F13) (MK559549), *Pseudocitrobacter anthropi* (F16) (MK559551), 粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* (F18) (MK559553), 格氏乳球菌 *Lactococcus garvieae* (F19) (MK559554), 产气克雷伯氏菌 *Klebsiella aerogenes* (F26) (MK559555), 赫尔曼亚特兰大杆菌 *Atlantibacter hermannii* (F31) (MK559556), 蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* (F45) (MK559557), 产气克雷伯氏菌 *Klebsiella aerogenes* (F49) (MK559558), 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (F50) (MK561600), 阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* (F59) (MK559559), 霍氏肠杆菌 *Enterobacter hormaechei* (F67) (MK559560) 均分离于 13 d 橘小实蝇雌虫肠道, 其发酵原液与甘油混合至终浓度为 20% 后, 保存于 -80 °C 冰箱。

1.3 供试器材

自制 Y 型嗅觉仪。如 Gu 等^[17]所述, 并稍加改动。自制嗅觉仪由气泵、流量计、空气过滤器、空气加湿器、分流管、味源瓶、自制收集器、Y 型管以及自制释放器组成。Y 型管柄长 20 cm, 两臂长 15 cm, 夹角 60°。主臂末端连接长 20 cm 自制释放器, 在两自制收集器末端中部放置一个 30 w 荧光灯, 保证两臂受光强度一致。两臂末端各连接一个长 20 cm 的自制收集器, 在两臂与自制收集器的连接处设有一锥形结构, 其顶部有一小孔, 供实蝇进入自制收集器, 收集器末端连接味源瓶。气泵鼓出气流依次经过流量计、空气过滤器、空气加湿器、分流管、味源瓶以及自制收集器后, 进入 Y 型管两臂 (图 1)。

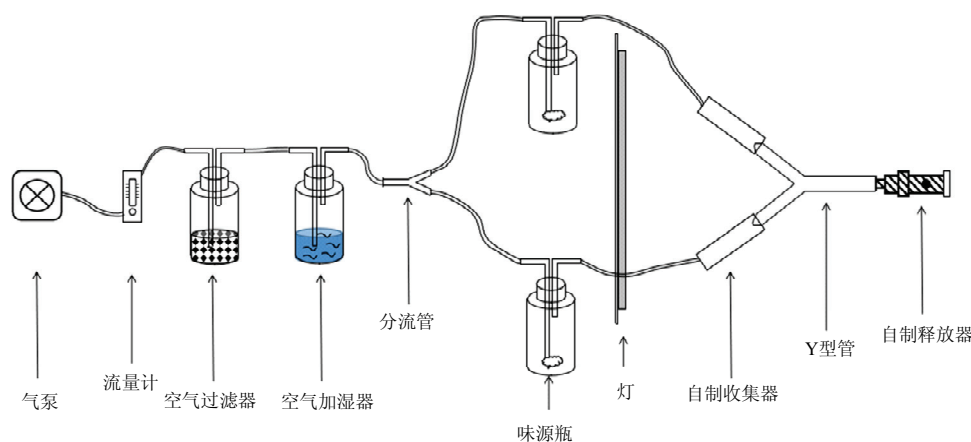


图1 自制Y型嗅觉仪

Fig. 1 Modified Y-tube olfactometer

1.4 肠道共生菌及其高压灭活上清液的制备

在无菌条件下, 将 15 株供试肠道共生菌分别接种于装有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶内, 37 °C、200 r/min 振荡培养 144 h, 量取 25 mL 至无菌的 50 mL 三角烧瓶中作为肠道菌发酵原液供试验用, 剩余 25 mL 发酵原液经 10000 r/min 离心 15 min 后, 转入 50 mL 无菌三角烧瓶中, 121 °C 高压灭菌 20 min, 作为高压灭活的上清液。

1.5 橘小实蝇雌虫对肠道共生菌及其高压灭活上清液的行为反应

用移液枪分别吸取 2 mL 的待测液(发酵原液或高压灭活的上清液)及对照组(LB 液体培养液)于脱脂棉, 然后分别将脱脂棉置于 Y 型嗅觉仪的 2 个味源瓶内。取橘小实蝇雌虫 20 头, 放入自制释放器中, 将自制释放器与 Y 型管相接后, 打开气泵, 流量计控制流速为 300 mL/min, 通气 5 min 后打开释放器的释放开关, 开始试验。分别在 10、20、30 min 时记录处理组及对照组收集瓶中的雌虫数量。每个待测样品重复 4 次, 每次试验后, 变换气味源方向, 并更换 Y 型管、收集瓶、气味源及味源瓶, 用 75%乙醇溶液润洗 Y 型管、收集瓶及味源瓶, 烘干后使用。试验在早上 9:00 至下午 17:00 之间进行, 试验条件: 温度(25 ± 1) °C, 相对湿度 RH(65 ± 5) %。

1.6 肠道共生菌及其高压灭活上清液对橘小实蝇雌虫的趋避作用

根据 1.5 的结果, 挑选出引诱率显著低于 LB 液体培养基的肠道菌, 以清水为对照组进一步验证其对雌虫是否具有趋避作用, 方法同 1.5。

1.7 数据统计与分析

利用 SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) 对数据进行处理, 采用 χ^2 检验对相关的试验数据进行统计学分析。反应率 (%) = 处理组和对照组的总虫数 / 总试虫数 × 100; 引诱率 (%) = 处理组或对照组的总虫数 / 总试虫数 × 100; 相对引诱率 (%) = (处理组总虫数 - 对照组总虫数) / 总试虫数 × 100。

2 结果与分析

2.1 橘小实蝇雌虫在不同时间点对不同菌液处理的气味选择

在 10、20、30 min 这 3 个测试时间段内, 相比于水(对照组), LB 液体培养基对橘小实蝇雌虫的引诱率没有达到显著水平 ($P > 0.05$)。由此可见, 后续试验中可使用 LB 液体培养基培育共生菌并作为对照组进行嗅觉行为测定(表 1)。

由表 2、3、4 的 χ^2 检验的结果可知, 在 10、20、30 min 这 3 个测试时间段内, 肠道菌 F8、F13、F19、F26、F45 和 F67 发酵原液对橘小实蝇雌虫引诱率均大于对照组(LB 液体培养基); 而 F16、F18 及 F31 发酵原液对雌虫引诱率均小于对照组。其中, 在 10 min 测试时间内, F8 和 F26 发酵原液对雌虫的引诱作用达到显著水平 ($P < 0.05$); 在 20 min 测试时间内, F26 发酵原液对雌虫的引诱作用达到极显著水平 ($P < 0.01$),

表 1 橘小实蝇雌虫在不同时间段对 LB 液体培养基的行为反应

Table 1 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the LB liquid medium within different time intervals

时间 Time (min)	引诱率 Attractive rate (%)		χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
	LB 液体培养基	水			
10	3.75±1.25	1.25±1.25	1.000	5.00	2.50
20	10.00±2.04	5.00±2.04	1.333	15.00	5.00
30	21.25±3.15	12.50±3.23	1.815	33.75	8.75

注：数据为平均值±标准误差。

Note: Data were presented as mean±SE.

表 2 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌发酵原液的行为反应 (10 min 内)

Table 2 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the fermented solutions of 15 gut bacteria (within 10 mins)

发酵原液 Fermented solution	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	13.75±2.39	21.25±7.46	1.28	35.00	-7.50
阴沟肠杆菌 (F8)	13.75±7.46	3.75±1.25	4.57*	17.50	10.00
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	6.25±1.25	5.00±0.00	0.11	11.25	1.25
<i>C. intestinale</i> (F11)	8.75±2.39	11.25±3.75	0.25	20.00	-2.50
肠杆菌属 (F13)	10.00±2.04	5.00±3.54	1.33	15.00	5.00
<i>P. anthropi</i> (F16)	5.00±2.88	10.00±6.12	1.33	15.00	-5.00
粪肠球菌 (F18)	15.00±3.54	21.25±5.15	0.86	36.25	-6.25
格氏乳球菌 (F19)	26.25±3.75	16.25±2.39	1.88	42.50	10.00
产气克雷伯氏菌 (F26)	25.00±5.40	10.00±3.53	5.41*	35.00	15.00
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	12.50±1.44	15.00±4.56	0.18	27.50	-2.50
蜡样芽孢杆菌 (F45)	2.50±1.44	1.25±1.25	0.33	3.75	1.25
产气克雷伯氏菌 (F49)	16.25±5.54	13.75±3.15	0.16	30.00	2.50
铜绿假单胞菌 (F50)	5.00±3.54	3.75±1.25	0.14	8.75	1.25
阴沟肠杆菌 (F59)	13.75±5.54	17.50±3.23	0.36	31.25	-3.75
霍氏肠杆菌 (F67)	16.25±6.25	12.50±4.79	0.39	28.75	3.75

注：表中数据为平均值±标准误差，*和**分别表示经卡方检验在 $P<0.05$ 水平上以及 $P<0.01$ 水平上差异显著。下表同。

Note: Data were mean±SE, * and ** represents significant difference at $P<0.05$ level and $P<0.01$ level by Chi-square test, respectively. The same as below.

而 F16 的忌避作用相比于对照组达到显著水平 ($P<0.05$)。在 30 min 测试时间内, F13、F26 和 F67 对雌虫的引诱作用达到显著水平 ($P<0.05$)，而 F16 和 F31 的忌避作用相比于对照组达到显著水平 ($P<0.05$) (表 2~4)。

在 10、20、30 min 这 3 个测试时间段内, 肠道菌 F19 高压灭活上清液对橘小实蝇雌虫引诱率均小于对照组, 其中, 在 20 和 30 min 内, 其忌避作用相比于对照组 (LB 液体培养基) 达到了显著水平 ($P<0.05$)。此外, 在 10、20、30 min 这 3 个测试时间段内, 除了 F11、F19 以及 F67 高压灭活上清液, 其他菌株的高压灭活上清液对雌虫的引诱率均大于对照组。其中, 在 10 min 测试时间内, F10 和 F50 对雌虫有显著的引诱作用 ($P<0.05$)；在 20 min 测试时间内, F8 和 F18 对雌虫有显著的引诱作用 ($P<0.05$)，而 F50 对雌虫有着极显著的引诱作用 ($P<0.01$)；在 30 min 测试时间内, F16、F31、F45 和 F59 对雌虫有显著的引诱作用 ($P<0.05$)，而 F8、F18 和 F50 对雌虫有极显著的引诱作用 ($P<0.01$) (表 5~7)。

基于前面试验的结果, 我们筛选出了相比于对照组 (LB 液体培养液) 具有显著忌避作用的肠道共生菌 *P. anthropi* (F16)、赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31) 发酵原液和格氏乳球菌 (F19) 高压灭活上清液, 并进一步研究它们对橘小实蝇雌虫的忌避作用。在 10、20、30 min 这 3 个测试时间段内, F16 对橘小实蝇雌

表 3 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌发酵原液的行为反应 (20 min 内)

Table 3 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the fermented solutions of 15 gut bacteria (within 20 mins)

发酵原液 Fermented solution	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	26.25±5.91	36.25±4.27	1.28	62.50	-10.00
阴沟肠杆菌 (F8)	27.50±9.68	17.50±4.33	1.77	45.00	10.00
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	10.00±2.04	12.50±3.23	0.22	22.50	-2.50
<i>C. intestinale</i> (F11)	20.00±2.04	16.25±3.75	0.31	36.25	3.75
肠杆菌属 (F13)	26.25±3.15	13.75±1.25	3.12	40.00	12.50
<i>P. anthropi</i> (F16)	18.75±8.26	35.00±4.56	3.93*	53.75	-16.25
粪肠球菌 (F18)	28.75±3.75	33.75±4.27	0.32	64.50	-5.00
格氏乳球菌 (F19)	36.25±5.54	27.50±5.20	0.96	63.75	8.75
产气克雷伯氏菌 (F26)	40.00±4.56	13.75±3.75	10.25**	53.75	26.25
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	17.50±3.23	28.75±6.25	2.18	46.25	-11.25
蜡样芽孢杆菌 (F45)	12.50±4.33	11.25±1.25	0.05	23.75	1.25
产气克雷伯氏菌 (F49)	23.75±5.54	25.00±5.40	0.02	63.75	-1.25
铜绿假单胞菌 (F50)	6.25±3.75	15.00±7.07	2.88	21.25	-8.75
阴沟肠杆菌 (F59)	33.75±6.25	30.00±5.40	0.17	63.75	3.75
霍氏肠杆菌 (F67)	37.50±4.33	21.25±5.54	3.59	58.75	16.25

表 4 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌发酵原液的行为反应 (30 min 内)

Table 4 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the fermented solutions of 15 gut bacteria (within 30 mins)

发酵原液 Fermented solution	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	35.00±12.46	53.75±4.27	3.16	88.75	-18.75
阴沟肠杆菌 (F8)	41.25±7.74	30.00±6.12	1.42	71.25	11.25
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	31.25±1.25	30.00±4.56	0.02	61.25	1.25
<i>C. intestinale</i> (F11)	35.00±5.00	30.00±7.91	0.30	65.00	5.00
肠杆菌属 (F13)	53.75±3.15	28.75±1.25	6.06*	84.50	25.00
<i>P. anthropi</i> (F16)	30.00±4.56	51.25±4.27	4.44*	81.25	-21.25
粪肠球菌 (F18)	38.75±2.39	45.00±4.56	0.37	83.75	-6.25
格氏乳球菌 (F19)	45.00±5.40	33.70±7.18	1.28	78.70	11.25
产气克雷伯氏菌 (F26)	47.50±4.33	18.75±4.27	9.98*	66.25	28.75
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	21.25±2.39	38.75±8.98	4.08*	60.00	-17.50
蜡样芽孢杆菌 (F45)	26.25±2.38	16.25±2.39	1.88	42.50	10.00
产气克雷伯氏菌 (F49)	38.75±6.57	33.75±6.25	0.27	86.25	5.00
铜绿假单胞菌 (F50)	17.50±4.33	27.50±8.29	1.77	45.00	-10.00
阴沟肠杆菌 (F59)	40.00±6.45	40.00±2.89	-	80.00	0.00
霍氏肠杆菌 (F67)	50.00±4.08	28.75±7.74	4.58*	78.75	21.25

虫的引诱率均小于对照组 (水), 其中, 在 30 min 测试时间段, F16 对雌虫具有显著忌避作用 ($P<0.05$) (表 8)。

3 讨论

作为昆虫的一个特殊“多功能器官”, 肠道共生菌在寄主营养、代谢和免疫等诸多生理功能上发挥着重要的作用^[18], 其潜在的生防价值也受到了广泛的关注。近年来, 许多研究表明肠道微生物能影响实蝇科

害虫的嗅觉行为反应^[19,20], 而有趣的是, 部分研究发现一些肠道菌如产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*、弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* 等能诱集到更多的雌性实蝇^[14,21]。本研究利用 Y 型嗅觉仪测试了橘小实蝇雌虫对其肠道菌发酵原液及其高压灭活上清液的嗅觉行为反应。结果表明, 肠道菌 F8、F13、F26、F67 发酵原液以及 F8、F10、F16、F18、F31、F45、F50 和 F59 高压灭活上清液对雌虫具有明显的引诱作

表 5 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌高压灭活上清液的行为反应 (10 min 内)

Table 5 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the autoclaved supernatant of 15 gut bacteria (within 10 mins)

高压灭活上清液 Autoclaved supernatant	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	6.25±2.39	5.00±3.54	0.11	11.25	1.25
阴沟肠杆菌 (F8)	8.75±3.15	7.50±5.95	0.07	16.25	1.25
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	26.25±3.75	12.50±3.23	3.90*	38.75	13.75
<i>C. intestinale</i> (F11)	5.00±3.53	13.75±4.73	3.26	18.75	-8.75
肠杆菌属 (F13)	7.50±2.50	6.25±2.39	0.09	13.75	1.25
<i>P. anthropi</i> (F16)	8.75±4.27	3.75±1.25	1.60	12.50	5.00
粪肠球菌 (F18)	10.00±3.54	3.75±1.25	2.27	13.75	6.25
格氏乳球菌 (F19)	11.25±5.15	17.50±7.77	1.08	28.75	-6.25
产气克雷伯氏菌 (F26)	25.00±9.79	15.00±5.40	2.00	40.00	10.00
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	10.00±3.53	3.75±1.25	2.27	13.75	6.25
蜡样芽孢杆菌 (F45)	8.75±4.27	3.75±2.39	1.60	12.50	5.00
产气克雷伯氏菌 (F49)	11.25±3.15	7.50±3.23	0.60	18.75	3.75
铜绿假单胞菌 (F50)	10.00±4.56	1.25±1.25	0.54*	11.25	8.75
阴沟肠杆菌 (F59)	11.25±4.27	8.75±5.54	0.25	20.00	2.50
霍氏肠杆菌 (F67)	8.75±2.39	11.25±3.15	0.25	20.00	-2.50

表 6 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌高压灭活上清液的行为反应 (20 min 内)

Table 6 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the autoclaved supernatant of 15 gut bacteria (within 20 mins)

高压灭活上清液 Autoclaved supernatant	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	21.25±3.75	21.25±6.25	-	42.50	0.00
阴沟肠杆菌 (F8)	31.25±3.75	15.00±6.77	4.56*	46.25	16.25
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	33.75±4.73	22.50±5.95	1.80	56.25	11.25
<i>C. intestinale</i> (F11)	26.25±6.57	26.25±3.15	-	52.50	0.00
肠杆菌属 (F13)	23.75±5.54	15.00±4.08	1.58	38.75	8.75
<i>P. anthropi</i> (F16)	15.00±2.89	10.00±2.04	0.80	25.00	5.00
粪肠球菌 (F18)	23.75±6.25	10.00±4.08	4.48*	33.75	10.00
格氏乳球菌 (F19)	16.25±5.15	33.75±8.98	4.90*	50.00	-17.50
产气克雷伯氏菌 (F26)	36.25±7.18	28.75±5.15	0.69	65.00	7.50
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	18.75±2.39	8.75±4.27	2.90	27.50	10.00
蜡样芽孢杆菌 (F45)	21.25±4.27	11.25±2.39	2.46	32.50	10.00
产气克雷伯氏菌 (F49)	25.00±4.08	15.00±3.54	2.00	40.00	10.00
铜绿假单胞菌 (F50)	27.50±7.22	7.50±1.44	9.14**	35.00	20.00
阴沟肠杆菌 (F59)	30.00±3.54	17.50±4.33	2.63	47.50	12.50
霍氏肠杆菌 (F67)	18.75±3.15	21.25±2.39	0.12	40.00	-2.50

表 7 橘小实蝇雌虫对 15 种肠道菌高压灭活上清液的行为反应 (30 min 内)

Table 7 The behavioral responses of *B. dorsalis* to the autoclaved supernatant of 15 gut bacteria (within 30 mins)

高压灭活上清液 Autoclaved supernatant	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	对照组引诱率 Attractive rate of control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
肠杆菌属 (F3)	35.00±2.89	33.75±8.26	0.01	68.75	1.25
阴沟肠杆菌 (F8)	55.00±5.40	21.25±5.54	11.95**	76.25	33.75
肺炎克雷伯氏菌 (F10)	42.50±4.33	32.50±5.20	1.06	75.00	10.00
<i>C. intestinale</i> (F11)	35.00±7.36	31.25±3.75	0.17	66.25	3.75
肠杆菌属 (F13)	43.75±5.54	28.75±4.27	2.48	72.50	15.00
<i>P. anthropi</i> (F16)	36.25±3.15	18.75±2.39	4.45*	55.00	17.50
粪肠球菌 (F18)	36.25±5.91	13.75±5.54	8.10**	50.00	22.50
格氏乳球菌 (F19)	23.75±6.25	43.75±6.57	4.74*	67.50	-20.00
产气克雷伯氏菌 (F26)	48.75±6.57	36.25±8.51	1.47	85.00	10.00
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	31.25±2.39	15.00±4.56	4.56*	46.25	16.25
蜡样芽孢杆菌 (F45)	42.5±3.23	21.25±3.75	5.66*	63.75	21.25
产气克雷伯氏菌 (F49)	35.00±7.36	28.75±6.57	0.49	63.75	6.25
铜绿假单胞菌 (F50)	51.25±7.18	10.00±2.04	22.22**	61.25	41.25
阴沟肠杆菌 (F59)	41.25±3.75	21.25±3.15	5.12*	62.50	20.00
霍氏肠杆菌 (F67)	27.5±5.20	28.75±2.39	0.02	56.25	1.25

表 8 橘小实蝇雌虫在不同时间段对 3 种肠道菌处理液行为反应

Table 8 The behavioral responses of *B. dorsalis* to 3 gut bacteria within different time intervals

处理组 Treatment	时间 Time (min)	处理组引诱率 Attractive rate of treatment (%)	清水对照组引诱率 Attractive rate of water control (%)	χ^2	反应率 Response rate (%)	相对引诱率 Relative attractive rate (%)
<i>P. anthropi</i> (F16)	10	1.25±1.25	3.75±3.75	1.00	5.00	-2.50
	20	7.50±4.79	17.50±4.33	3.20	25.00	-10.00
	30	11.25±3.75	27.50±3.23	5.45*	38.75	-16.25
赫尔曼亚特兰大杆菌 (F31)	10	6.25±2.39	6.25±3.75	-	13.00	0.00
	20	11.25±1.25	18.75±5.54	1.50	30.00	-7.50
	30	20.00±5.40	26.25±7.18	0.67	46.25	-6.25
格氏乳球菌 (F19) (AS)	10	2.50±1.44	2.50±2.50	-	5.00	0.00
	20	10.00±2.04	11.25±4.27	0.05	21.25	-1.25
	30	13.75±1.25	18.75±5.15	0.61	32.50	-5.00

注: AS 代表高压灭活上清液。

Note: AS means the autoclaved supernatant.

用, 这与前人的研究结果相似^[21,22]。此外, 部分肠道菌对雌虫无引诱效果, 其中, F16 发酵原液在 30 min 的测试时间内, 对橘小实蝇雌虫具有显著的趋避效果。有研究表明, 一些肠道菌对于实蝇并不存在引诱活性^[14,23], 但并未有人对肠道菌的忌避作用进行深入研究。此外, Luo 等^[15]发现经过高压灭活后的肠道菌上清液对于南亚寡鬃实蝇 *Zeugodacus tau* 的引诱性显著高于发酵原液, 本研究结果与其结果相似: 一些肠道菌的发酵原液如 F16、F31 及 F50 对橘小实蝇雌虫无引诱作用, 但经过高压灭活后, 其上清液则对雌虫具有显著的引诱作用, 说明这些发酵原液经过离心和高压灭活后, 能释放对于雌虫具有引诱活性的物质。在未来的田间应用中, 高压灭活的上清液相比于发酵原液可能具有更高的应用前景, 因为无需考虑生物安全的问题, 且相较于活菌, 高压灭活的菌液更容易储存和使用。

橘小实蝇雌虫对不同菌液的嗅觉反应程度与时间相关,即雌虫对不同的肠道菌处理物的嗅觉反应时间是不同的。如,F59 高压灭活上清液在 10 min 以及 20 min 内对雌虫无显著引诱作用,而当时间延长到 30 min 时,其对雌虫的引诱作用达到显著水平。F11 发酵原液在 10 min 内的引诱率低于对照组,随着测试时间的推移,在 30 min 时,其对雌虫引诱率高于对照组。王兰英等^[24]发现柑橘果皮精油和金橘叶精油对橘小实蝇的趋避效果随着时间的增加而减小,张淑颖等^[25]发现橘小实蝇雌虫对于芒果的吸引反应随时间而增强,以上研究与本研究结果类似,证明橘小实蝇气味选择反应存在时间效应。

除了对寄主具有潜在的引诱性,部分肠道菌发酵液已被证实对寄主具有直接的致病作用^[26,27],Meriem 等^[28]将肠道菌雷氏普罗威登斯菌 *Providencia rettgeri* 的发酵原液接种至地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Weidemann) 成虫体内,发现该菌对于地中海实蝇具有显著的致病效果。除此之外,肠道中的潜在致病菌还能与生防真菌以及细菌共同作用致使宿主死亡。Caccia 等^[29]发现当苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 侵染宿主并对宿主的肠道上皮细胞造成损伤后,一些肠道微生物如沙雷氏菌属 *Serratia* 以及梭菌属 *Clostridium* 通过伤口扩散至胸腔,从而加速寄主的死亡。Wei 等^[30]发现肠道菌黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 在球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 感染斯氏按蚊 *Anopheles Stephensi* 后,大量增殖并转移至血淋巴中,造成斯氏按蚊的死亡。因此,如果能筛选出一种具有“诱杀”功能的肠道菌,将对橘小实蝇的田间防控具有重大意义。

昆虫识别肠道菌及其挥发物是一个复杂的过程,而肠道微生物在发酵过程中产生的化学物质是引起昆虫嗅觉反应的本质原因^[31],许多学者分析对实蝇具有引诱作用的肠道菌的挥发物,发现醇类、酸类、酮类等物质含量往往较高^[16,19,21,32],但是,目前并未有关于肠道菌单一挥发物对橘小实蝇嗅觉反应作用及其触角电位 (EAG) 反应的研究。此外,肠道菌互相混合对橘小实蝇成虫作用效果如何,以及是否能作为常见实蝇引诱剂的增效剂,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Clarke A R, Armstrong K F, Carmichael A E, et al. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies[J]. Annual Review of Entomology, 2005, 50: 293-319.
- [2] Chen J Y, Cai P, Zhang G B, et al. Research progress of occurrence and comprehensive control of oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[J]. Plant Diseases and Pests, 2011, 39(5): 17324-17326.
- [3] Jin T, Zeng L, Lin Y, et al. Insecticide resistance of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), in mainland China[J]. Pest Management Science, 2011, 67(3): 370-376.
- [4] Shelly T E, Edu J, Mcinnis D. Pre-release consumption of methyl eugenol increases the mating competitiveness of sterile males of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in large field enclosures[J]. Journal of Insect Science, 2010, 10(8): 1-16.
- [5] 姚明燕, 季清娥, 陈家骅. 实蝇肠杆菌科共生菌的研究进展[J]. 生物安全学报, 2017(2): 103-110.
- [6] Ben-Yosef M, Aharon Y, Jurkevitch E, et al. Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2010, 277(1687): 1545-1552.
- [7] Cheng D, Guo Z, Riegler M, et al. Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 13.
- [8] Khaeso K, Andongma A A, Akami M, et al. Assessing the effects of gut bacteria manipulation on the development of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera; Tephritidae)[J]. Symbiosis, 2017(9): 1-9.
- [9] Augustinos A A, Kyritsis G A, Papadopoulos N T, et al. Exploitation of the medfly gut microbiota for the enhancement of sterile insect technique: Use of *Enterobacter* sp. in larval diet-based probiotic applications[J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0136459.
- [10] Yao M, Zhang H, Cai P, et al. Enhanced fitness of a *Bactrocera cucurbitae* genetic sexing strain based on the addition of gut-isolated probiotics (*Enterobacter* spec.) to the larval diet[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2017, 162(2): 197-203.
- [11] Ami E B, Yuval B, Jurkevitch E. Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance[J]. The ISME Journal, 2009, 4(1): 28-37.
- [12] 李雨珊. 肠道共生菌对橘小实蝇雌虫生殖力的影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.

- [13] 张琪文, 花若晗, 王聪, 等. 肠道可培养共生菌对橘小实蝇不育雄虫生物学特征的影响[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(1): 24-30.
- [14] Naaz N, Choudhary J S, Prabhakar C S, *et al.* Identification and evaluation of cultivable gut bacteria associated with peach fruit fly, *Bactrocera zonata*(Diptera: Tephritidae)[J]. *Phytoparasitica*, 2016, 44(2): 165-176.
- [15] Luo M, Zhang H, Du Y, *et al.* Molecular identification of cultivable bacteria in the gut of adult *Bactrocera tau* (Walker) and their trapping effect: Trapping effect of cultivable bacteria from *Bactrocera tau*[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(12): DOI: 10.1002/ps.5074.
- [16] Piper A M, Farnier K, Linder T, *et al.* Two gut-associated yeasts in a tephritid fruit fly have contrasting effects on adult attraction and larval survival[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2017, 43(9): 891-901.
- [17] Gu X, Cai P, Yang Y, *et al.* The response of four braconid parasitoid species to methyl eugenol: optimization of a biocontrol tactic to suppress, *Bactrocera dorsalis*[J]. *Biological Control*, 2018, 122: 101-108.
- [18] 王四宝, 曲爽. 昆虫共生菌及其在病虫害防控中的应用前景[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(8): 65-74.
- [19] Jang E B, Nishijima K A. Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Environmental Entomology*, 1990, 19(6): 1726-1731.
- [20] Liscia A, Angioni P, Sacchetti P, *et al.* Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 59(7): 705-716.
- [21] Hadapad A B, Prabhakar C S, Chandekar S C, *et al.* Diversity of bacterial communities in the midgut of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) populations and their potential use as attractants[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(6): 1222-1230.
- [22] Wang H, Jin L, Peng T, *et al.* Identification of cultivable bacteria in the intestinal tract of *Bactrocera dorsalis* from three different populations and determination of their attractive potential[J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(1): 8-16.
- [23] Reddy K, Sharma K, Singh S. Attractancy potential of culturable bacteria from the gut of peach fruit fly, *Bactrocera zonata*(Saunders)[J]. *Phytoparasitica*, 2014, 42(5): 691-698.
- [24] 王兰英, 骆焱平, 卢远倩, 等. 23种植物精油对橘小实蝇的行为反应研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(12): 2336-2339.
- [25] 张淑颖, 肖春, 李正跃, 等. 芒果挥发物对桔小实蝇成虫的引诱作用[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 659-664.
- [26] 王洪秀. 橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)成虫肠道细菌分子多态性分析及其功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [27] Galac M R, Lazzaro B P. Comparative pathology of bacteria in the genus *Providencia* to a natural host, *Drosophila melanogaster*[J]. *Microbes & Infection*, 2011, 13(7): 673-683.
- [28] Meriem M G, Wafa D, Kamel C, *et al.* Evaluation of *Providencia rettgeri* pathogenicity against laboratory Mediterranean fruit fly strain (*Ceratitis capitata*)[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(5): e0196343.
- [29] Caccia S, Lelio I D, Storia A L, *et al.* Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(34): 9486-9491.
- [30] Wei G, Lai Y, Wang G, *et al.* Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(23): 5994-5999.
- [31] Leroy P D, Sabri A, Verheggen F J, *et al.* The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects[J]. *Chemoecology*, 2011, 21(3): 113-122.
- [32] Epsky N D, Heath R R, Dueben B D, *et al.* Attraction of 3-Methyl-1-Butanol and ammonia identified from *Enterobacter agglomerans* to *Anastrepha suspensa*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1998, 24(11): 1867-1880.