

广粪蚊共生菌发酵液对宿主嗅觉行为反应的影响及其挥发物成分分析

李炳宏, 王剑峰*, 王丹丹

(沈阳大学 生命科学与工程学院 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 中国辽宁 沈阳 110044)

摘要: 广粪蚊 [*Coboldia fuscipes* (Meigen)] 是食用菌的主要害虫之一, 昆虫共生菌潜在的生防价值为广粪蚊的绿色防治提供了新的思路。本研究首先使用 Y 型嗅觉仪测试了广粪蚊成虫对其 14 科 16 属 21 种共生菌发酵液在 10 min、20 min、30 min 3 个测试时间段内的嗅觉行为反应。结果表明, 水生产碱菌 (*Alcaligenes aquatilis*)、柠檬酸杆菌未知种 (*Citrobacter* sp.)、格陵兰变色杆菌 (*Paenochrobactrum glaciei*) 3 种共生菌的发酵液对广粪蚊成虫具有显著的引诱作用, 沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*) 发酵液对广粪蚊成虫具有显著的趋避作用, 其 30 min 时的相对引诱率分别达到了 20.00%、13.75%、15.00% 和 -18.75%。随后, 基于气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析了上述 4 种发酵液的挥发物。结果显示, 共鉴定出相对含量高于 2% 的化合物 28 种, 水生产碱菌与格陵兰变色杆菌发酵液中相对含量最高的挥发物是苯甲醛, 其次分别是 2,5-二甲基吡嗪和十二烷二腈; 柠檬酸杆菌未知种发酵液中相对含量最高的挥发物是 N-苯基甲酰胺, 其次是异戊酸异戊酯; 沙福芽孢杆菌发酵液中相对含量最高的挥发物是异戊酸乙酯, 其次是异戊酸异丙酯。本研究明确了发酵液对广粪蚊成虫具有引诱与趋避作用的共生菌, 并且测定了发酵液挥发物的具体成分, 为开发广粪蚊引诱剂或驱避剂提供了依据。

关键词: 广粪蚊; 共生菌; Y 型嗅觉测试仪; 嗅觉行为; 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS); 挥发物成分分析

中图分类号: Q939.9, Q969.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)03-0232-09

Effects of Fermentation Broths of Symbiotic Bacteria in *Coboldia fuscipes* (Meigen) on Host Olfactory Behavioral Responses and Analysis of Volatiles

LI Binghong, WANG Jianfeng*, WANG Dandan

(Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China)

Abstract: *Coboldia fuscipes* (Meigen) is one of the main pests of edible fungi. The symbiotic bacteria in the insect may have a potential biocontrol value and be used in green control of the insect. Herein, the Y-type olfactory tester was used to test the olfactory behavior responses of the *C. fuscipes* adults to the fermentation broths of 21 symbiotic bacteria, which belong to 16 genera in 14 families, in 3 test periods of 10 min, 20 min and 30 min. The results showed that the fermentation broths of *Alcaligenes aquatilis*, *Citrobacter* sp. and *Paenochrobactrum glaciei* had a significant attractant effect on the adults, while the fermentation broth of *Bacillus safensis* had a significant repellent effect on the adults. The relative attractive rates of these four broths reached 20.00%, 13.75%, 15.00% and -18.75% in 30 min, respectively. Then the volatiles of the four fermentation broths were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that 28 compounds with the relative content higher than 2% were identified. In both *A. aquatilis* and *P.*

收稿日期: 2023-11-25; 修回日期: 2024-02-01; 网络首发日期: 2024-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31672332); 辽宁省自然科学基金项目(2019-ZD-0539)

作者简介: 李炳宏(1999-), 男, 辽宁大连人, 硕士研究生; *通信作者: 王剑峰(1980-), 男, 河北张家口人, 博士, 教授, 主要从事昆虫分子系统学研究, Tel: 024-62268625, E-mail: wangjif80@126.com

glaciei broths, benzaldehyde is the most abundant volatile, followed by pyrazine, 2,5-dimethyl- and 1,10-dicyanodecane, respectively. The relative content of formamide, *N*-phenyl- was the highest in *C. sp.*, followed by butanoic acid, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester. The relative content of butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester was the highest in *B. safensis*, followed by butanoic acid, 3-methyl-, 1-methylethyl ester. In conclusion, the symbiotic bacteria with attractant or repellent effect on adult *C. fuscipes* were identified, and specific components in the volatiles were determined, which would benefit the development of attractants or repellents for *C. fuscipes*.

Key words: *Coboldia fuscipes* (Meigen); symbiotic bacteria; Y-type olfactory tester; olfactory behavior; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); analysis of volatiles

(*Life Science Research*, 2024, 28(3): 232-240)

广粪蚊[*Coboldia fuscipes* (Meigen)]隶属于双翅目(Diptera)粪蚊科(Scatopsidae)^[1]。成虫黑色,幼虫多灰白色或黄褐色。广粪蚊是食用菌的主要害虫之一,寄主为平菇、金针菇、香菇和灰树花等,它主要以幼虫为害培养料,影响子实体的产量,致使食用菌减产甚至绝收^[2-3]。目前,广粪蚊的防治主要以物理灭虫和化学药物熏蒸为主,而食用菌种植周期较短,使用化学药物易出现农药残留,因此开发新型绿色农药对于广粪蚊的有效防治具有重要意义^[4]。

昆虫体内存在着多种共生菌,共生菌与昆虫协同进化、互利共生,具有帮助宿主完成营养代谢、抵御敌害、降解有毒物质及调节宿主繁殖等诸多功能^[5-12]。共生菌作为昆虫的一个特殊“多功能器官”,其潜在的生物防治价值也受到了广泛关注^[13]。一些研究表明,某些昆虫的共生菌发酵液能够引起宿主的嗅觉行为反应,例如,共生菌发酵液挥发物中的某些醇类、酯类、醛类与含氮化合物等物质对墨西哥果蝇(*Anastrepha ludens*)、橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)、瓜实蝇(*B. cucurbitae*)与南瓜实蝇(*B. tau*)等多种昆虫具有引诱作用^[14-18]。这无疑为食用菌害虫的绿色防治提供了新的思路。本研究选取广粪蚊提取的可培养共生菌的发酵液,测试广粪蚊成虫对其的嗅觉行为反应,探究广粪蚊共生菌发酵液对宿主是否具有引诱或趋避作用,并测定可引起宿主显著反应的共生菌发酵液挥发物的主要成分,以期开发绿色新型的广粪蚊引诱剂或趋避剂提供前期数据基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

广粪蚊采集自辽宁省沈阳市铁西区彰驿菇房,在沈阳大学辽宁省城市有害生物治理与生态

安全重点实验室饲养。

1.2 供试菌种

供试菌种由王丹丹^[4]筛选,来自广粪蚊不同发育阶段,共14科16属21种(表1)。

1.3 主要器材

自制Y型嗅觉仪:Y型管(柄长20 cm,两臂长15 cm,内径1.8 cm,夹角60°),味源瓶(400 mL广口瓶,四川蜀玻集团有限责任公司),微型气体流量泵(5v2a-DAQ,河北荣凯达机电设备公司);冷冻离心机(ST 16R,德国赛默飞公司);恒温培养振荡器(ZDP-15,上海精宏实验设备有限公司);气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS; GGT 0620,广州禾信仪器股份有限公司);全自动多功能在线前处理进样平台(CTC PAL RTC,广州禾信仪器股份有限公司)。

1.4 广粪蚊嗅觉行为反应试验

1.4.1 共生菌发酵液的制备

在无菌条件下,将21株供试菌种分别接种于装有30 mL LB液态培养基的锥形瓶内,37℃、180 r/min振荡培养7 d;取适量发酵液至离心管中,10 000 r/min离心15 min去除菌体后备用。

1.4.2 嗅觉行为反应测试

分别取2 mL待测液(处理组)及纯水(对照组)置于味源瓶内,打开气体流量泵,设定流速500 mL/min,预先通气5~10 min。取未交配成虫20头,饥饿处理2 h后,放入释放器中,将释放器与Y型管相接后,开始测试。每个待测样品重复4次,每次试验后,变换气味源方向,清洗Y型管、收集瓶。测试在9:00至17:00之间进行,温度(25±1)℃,相对湿度(65±5)%。

1.4.3 数据处理

根据薛明等^[19]对韭菜迟眼蕈蚊(*Bradysia odori-phaga*)的研究可知,嗅觉反应在10 min后选择基本

表 1 广囊蚊可培养共生菌

Table 1 Culturable symbiotic bacteria of *C. fuscipes*

序号 No.	科名 Family name	属名 Genus name	种名 Species name	筛选阶段 Collection phase
1	产碱菌科 Alcaligenaceae	产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	水生产碱菌 <i>Alcaligenes aquatilis</i> Van Trappen <i>et al.</i> 2005	卵, 1~2 龄幼虫 Ovum, 1st~2nd instar larvae
2			粪产碱菌 <i>Alcaligenes faecalis</i> Castellani & Chalmers. 1919	卵 Ovum
3	芽孢杆菌科 Bacillaceae	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	高山芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i> Shivaji <i>et al.</i> 2006	3 龄幼虫 3rd instar larva
4			短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> Meyer and Gottheil. 1901	1~3 龄幼虫, 蛹 1~3 instar larvae, pupa
5			沙福芽孢杆菌 <i>Bacillus safensis</i> Satomi <i>et al.</i> 2006	1~2 龄和 4 龄幼虫, 蛹 1~2 instar larvae, pupa
6			同温层芽孢杆菌 <i>Bacillus stratosphericus</i> Shivaji <i>et al.</i> 2006	1 龄和 3~4 龄幼虫 1st and 3rd~4th instar larvae
7			芽孢杆菌未知种 <i>Bacillus</i> sp.	2~4 龄幼虫 2nd~4th instar larvae
8	布鲁氏菌科 Brucellaceae	变色杆菌属 <i>Paenochrobactrum</i>	格陵兰变色杆菌 <i>Paenochrobactrum glaciei</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2010	卵 Ovum
9	伯克氏菌科 Burkholderiaceae	贪铜菌属 <i>Cupriavidus</i>	耐金属贪铜菌 <i>Cupriavidus metallidurans</i> Vandamme & Coenye. 2004	3 龄幼虫 3rd instar larva
10	柄杆菌科 Caulobacteraceae	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	缺陷短波单胞菌 <i>Brevundimonas diminuta</i> Segers <i>et al.</i> 1994	卵 Ovum
11	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae	俊片菌属 <i>Lampropedia</i>	潮汐俊片菌 <i>Lampropedia aestuarii</i> Zhao <i>et al.</i> 2020	卵 Ovum
12	原小单胞菌科 Promicromonosporaceae	纤维菌属 <i>Cellulosimicrobium</i>	芬克纤维微菌 <i>Cellulosimicrobium funkei</i> Brown <i>et al.</i> 2006	3 龄幼虫 3rd instar larva
13	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	西地西菌属 <i>Cedecea</i>	奈氏西地西菌 <i>Cedecea neteri</i> Farmer <i>et al.</i> 1983	成虫 Adult
14		柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	柠檬酸杆菌未知种 <i>Citrobacter</i> sp.	成虫 Adult
15	溶杆菌科 Lysobacteraceae	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	象形寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas pictorum</i> Ouattara <i>et al.</i> 2017	卵 Ovum
16	微杆菌科 Microbacteriaceae	亮杆菌属 <i>Leucobacter</i>	驹形亮杆菌 <i>Leucobacter komagatae</i> Takeuchi <i>et al.</i> 1996	2~3 龄幼虫, 蛹, 成虫 2nd~3rd instar larvae, pupa, adult
17	戈登氏菌科 Gordoniaceae	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	伊戈登氏菌 <i>Gordonia iterans</i> Kang <i>et al.</i> 2014	4 龄幼虫 4th instar larva
18	红杆菌科 Rhodobacteraceae	副球菌属 <i>Paracoccus</i>	中华副球菌 <i>Paracoccus chinensis</i> Li <i>et al.</i> 2009	卵 Ovum
19	鞘氨醇杆菌科 Sphingobacteriaceae	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	土地鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium humi</i> Lee <i>et al.</i> 2017	成虫 Adult
20	威克斯氏菌科 Weeksellaceae	金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i>	内生金黄杆菌 <i>Chryseobacterium endophyticum</i> Lin <i>et al.</i> 2017	成虫 Adult
21		稳杆菌属 <i>Empedobacter</i>	短稳杆菌 <i>Empedobacter brevis</i> Vandamme <i>et al.</i> 1994	4 龄幼虫 4th instar larva

稳定。因此, 本研究设定了 10 min、20 min、30 min 3 个测试时间段, 分别记录各时间段处理组及对照组收集瓶中的成虫数量, 并利用 IBM SPSS Statistics 27 (27.0.1) 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(response rate, R_r)、引诱率(attractive rate, R_a)、处理组引诱率(attractive rate of treatment, R_{at})、对照组引诱率(attractive rate of control, R_{ac})、相对引诱率(relative attractive rate, R_{ar})的计算公式如下:

$$R_r = (N_{\text{处理组}} + N_{\text{对照组}}) / N_{\text{总试虫}} \times 100\%$$

$$R_a = N_i / N_{\text{总试虫}} \times 100\%$$

$$R_{at} = N_{\text{处理组}} / N_{\text{总试虫}} \times 100\%$$

$$R_{ac} = N_{\text{对照组}} / N_{\text{总试虫}} \times 100\%$$

$$R_{ar} = (N_{\text{处理组}} - N_{\text{对照组}}) / N_{\text{总试虫}} \times 100\%$$

其中, $N_{\text{处理组}}$ 表示处理组虫数, $N_{\text{对照组}}$ 表示对照组虫数, $N_{\text{总试虫}}$ 表示总试虫数, N_i 表示 i 组虫数。

1.5 共生菌发酵液挥发物的成分分析

1.5.1 GC-MS 分析

萃取头 230 °C 老化 15 min; 预孵化 15 min, 预孵化振荡速度 450 r/min, 加热温度 60 °C; 萃取

深度 32 mm, 萃取 40 min; 进样深度 60 mm, 脱附 180 s。不分流进样, 第一维色谱柱为 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 第二维色谱柱为 DB-17 (1.1 m×0.18 mm×0.18 μm), 载气为氦气, 色谱柱恒定流量 1 mL/min; 柱箱程序升温: 40 °C 保持 3 min, 以 3 °C/min 升温到 250 °C, 保持 2 min。电子轰击源灯丝发射电流 100 μA, 电离能 70 eV; 离子源温度 230 °C, 接口温度 250 °C; 检测器电压为 -1 800 V; 采集质量范围为 50~550 amu, 采集速度为 100 谱/秒, 无溶剂延迟。

1.5.2 数据处理

采用全二维数据处理工作站软件 Canvas 分析数据, 自动识别信噪比大于 30 的峰, 通过对每个化合物的质谱图进行谱库比对检索, 同时结合相对保留指数(relative retention index, RRI)等信息, 对化合物进行定性分析, 并采用峰面积归一化法自动生成各成分的相对含量。

2 结果

2.1 嗅觉行为反应测试结果

本研究共测试了广粪蚊成虫对其 14 科 16 属 21 种共生菌发酵液的嗅觉行为反应, 其中 3 种共生菌发酵液对广粪蚊成虫的引诱率均显著高于对

对照组, 1 种共生菌发酵液对宿主成虫的引诱率显著低于对照组, 其余 17 种共生菌的发酵液对宿主的引诱率或趋避率均未达到显著水平。

在引诱率或趋避率达到显著水平的 4 种共生菌发酵液中, 水生产碱菌(*Alcaligenes aquatilis*)发酵液在 20 min 时对宿主的引诱作用达到显著水平($P<0.05$), 在 30 min 时对宿主的引诱作用达到了极显著水平($P<0.01$); 柠檬酸杆菌未知种(*Citrobacter* sp.)发酵液在 30 min 时对宿主的引诱作用达到显著水平($P<0.05$); 格陵兰变色杆菌(*Paenochrobactrum glaciei*)发酵液在 3 段测试时间内对宿主的引诱作用均达到显著水平($P<0.05$); 而沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)发酵液在 10 min 时对宿主的趋避作用相比于对照组达到显著水平($P<0.05$), 在 20 min、30 min 时达到了极显著水平($P<0.01$) (图 1, 表 2~4)。

2.2 共生菌发酵液挥发物成分分析结果

本研究通过 GC-MS 分析了 4 种可引起宿主显著嗅觉行为反应的共生菌发酵液的挥发物, 共鉴定出 263 种化合物, 其中相对含量高于 2% 的化合物有 28 种(图 2)。

在水生产碱菌发酵液挥发物中, 我们共鉴定出 103 种化合物, 其中相对含量高于 2% 的 10 种, 分

表 2 广粪蚊成虫对 21 种共生菌发酵液的嗅觉行为反应(10 分钟)

Table 2 Olfactory behavioral responses of adult *C. fuscipes* to fermentation broths of 21 commensal bacteria (in 10 min)

序号 No.	菌种 Species	处理组引诱率 $R_m/(%)$	对照组引诱率 $R_c/(%)$	反应率 $R_r/(%)$	相对引诱率 $R_{m/c}/(%)$	卡平方 χ^2	P 值 P value
1	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	18.75±2.39	10.00±4.79	28.75	8.75	2.76	0.095
2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	6.25±2.39	12.50±2.50	18.75	-6.25	2.07	0.157
3	<i>Bacillus altitudinis</i>	10.00±3.54	8.75±2.39	18.75	1.25	0.52	0.819
4	<i>Bacillus pumilus</i>	3.75±2.39	8.75±2.39	12.50	-5.00	1.92	0.166
5	<i>Bacillus safensis</i>	3.75±1.25	12.50±2.50	16.25	-8.75	3.77*	<0.05
6	<i>Bacillus stratosphericus</i>	10.00±3.54	8.75±2.39	18.75	1.25	0.52	0.819
7	<i>Bacillus</i> sp.	10.00±4.33	7.50±1.44	17.50	2.50	0.22	0.637
8	<i>Paenochrobactrum glaciei</i>	13.75±2.39	3.75±2.39	17.50	10.00	5.57*	<0.05
9	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	8.75±2.39	5.00±1.89	13.75	3.75	1.14	0.285
10	<i>Brevundimonas diminuta</i>	7.50±3.22	7.50±1.44	15.00	0	—	—
11	<i>Lamprospedia aestuarii</i>	8.75±3.23	8.75±1.25	17.50	0	—	—
12	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	8.75±3.15	11.25±2.39	20.00	-2.50	0.21	0.665
13	<i>Cedecea neteri</i>	21.25±2.39	20.00±2.04	41.25	1.25	0.02	0.876
14	<i>Citrobacter</i> sp.	12.50±1.44	6.25±2.39	18.75	6.25	2.00	0.157
15	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	10.00±2.04	8.75±1.25	18.75	1.25	0.06	0.819
16	<i>Leucobacter komagatae</i>	8.75±2.04	12.50±3.75	21.25	-3.75	0.73	0.349
17	<i>Gordonia iterans</i>	13.75±3.15	16.25±1.25	30.00	-2.50	0.14	0.715
18	<i>Paracoccus chinensis</i>	13.75±3.15	10.00±4.08	23.75	3.75	0.67	0.414
19	<i>Sphingobacterium humi</i>	11.25±2.39	5.00±1.44	16.25	6.25	2.25	0.134
20	<i>Chryseobacterium endophyticum</i>	5.00±2.04	7.50±2.50	12.50	-2.50	0.69	0.405
21	<i>Empedobacter brevis</i>	11.25±1.25	6.25±2.39	17.50	5.00	1.47	0.225

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

Notes: Data are expressed as mean ± standard error. * represents significant difference at $P<0.05$ level by Chi-square test.

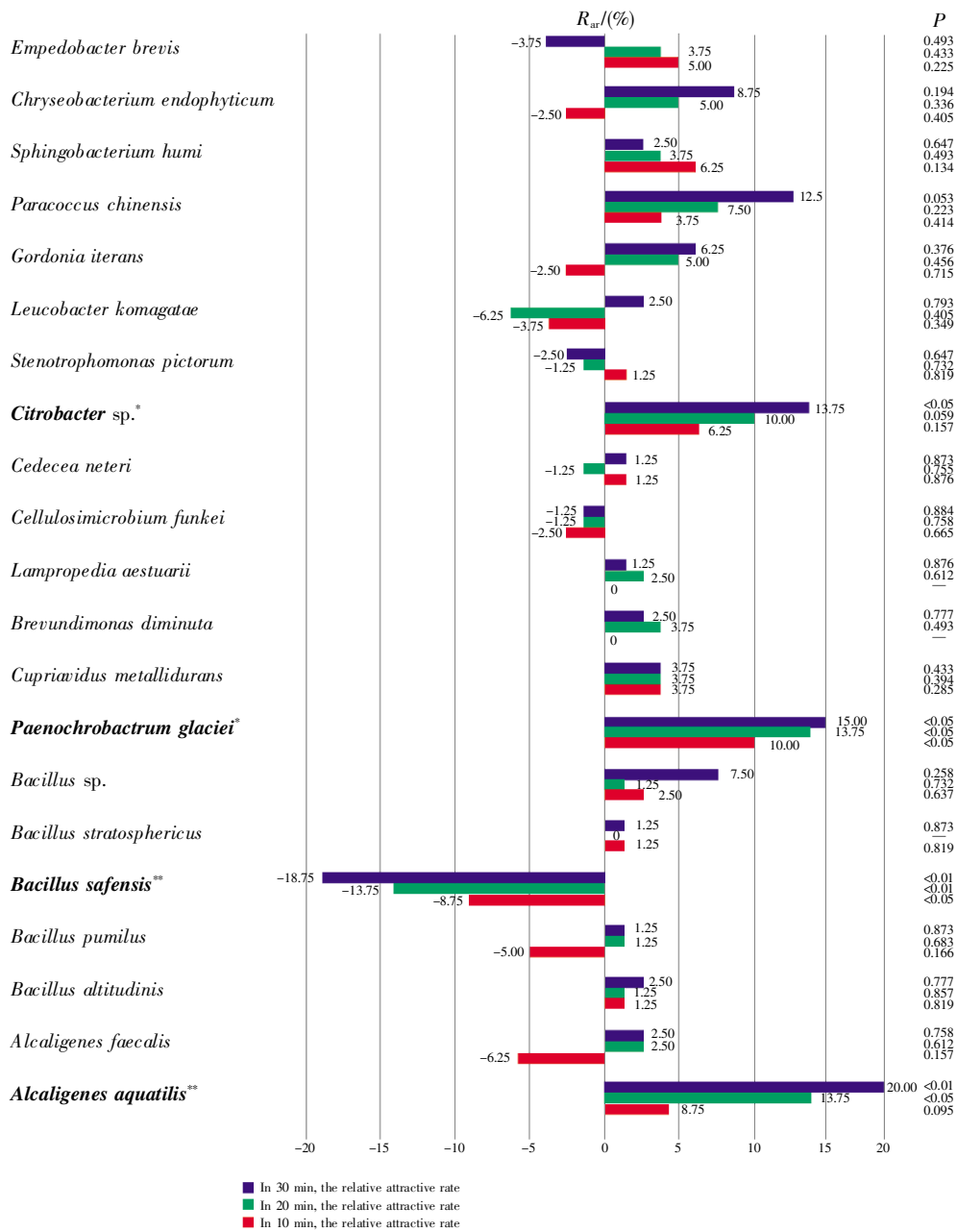


图1 广囊蚊成虫对21种共生菌发酵液的嗅觉行为反应
*和**分别表示经卡方检验在P<0.05以及P<0.01水平上差异显著。

Fig.1 Olfactory behavioral responses of adult *C. fuscipes* to fermentation broths of 21 commensal bacteria
* and ** represent significant difference at P<0.05 level and P<0.01 level, respectively, by Chi-square test.

别为苯甲醛(benzaldehyde) (24.015%)、2,5-二甲基吡嗪(pyrazine, 2,5-dimethyl-) (10.728%)、异戊酸乙酯(butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester) (8.459%)、乙酸对甲酚酯(acetic acid, 4-methylphenyl ester) (5.841%)、异戊酸异丙酯(butanoic acid, 3-methyl-, 1-methylethyl ester) (3.759%)、甲磺酰乙酸(methanesulfonylacetic acid) (3.199%)、3-乙基-2,5-二甲基吡嗪(pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-) (2.881%)及二甲基二硫醚(disulfide, dimethyl) (2.541%)等。

在柠檬酸杆菌未知种发酵液挥发物中, 我们共鉴定出121种化合物, 其中相对含量高于2%的16种, 分别为N-苯基甲酰胺(formamide, N-phenyl-) (9.454%)、异戊酸异戊酯(butanoic acid, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester) (7.043%)、异戊酸乙酯(6.097%)、二甲基二硫醚(5.693%)、萘(naphthalene) (4.477%)、丙酸异戊酯(1-butanol, 3-methyl-, propanoate) (4.081%)、异戊酸异丙酯(3.847%)及戊醇(1-pentanol) (3.076%)等。

表 3 广粪蚊成虫对 21 种共生菌发酵液的嗅觉行为反应(20 分钟)

Table 3 Olfactory behavioral responses of adult *C. fuscipes* to fermentation broths of 21 commensal bacteria (in 20 min)

序号 No.	菌种 Species	处理组引诱率 $R_{a1}/(\%)$	对照组引诱率 $R_{a2}/(\%)$	反应率 $R_r/(\%)$	相对引诱率 $R_{ra}/(\%)$	卡平方 χ^2	P 值 P value
1	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	27.50±3.15	13.75±1.25	41.25	13.75	4.67*	<0.05
2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	18.75±2.39	16.25±3.15	35.00	2.50	0.25	0.612
3	<i>Bacillus altitudinis</i>	16.25±2.39	15.00±2.04	31.25	1.25	0.03	0.857
4	<i>Bacillus pumilus</i>	12.50±1.44	11.25±2.39	23.75	1.25	0.17	0.683
5	<i>Bacillus safensis</i>	5.00±2.04	18.75±2.39	23.75	-13.75	8.17**	<0.01
6	<i>Bacillus stratosphericus</i>	15.00±2.04	15.00±3.54	30.00	0	—	—
7	<i>Bacillus</i> sp.	17.50±1.44	16.25±3.15	33.75	1.25	0.12	0.732
8	<i>Paenochrobactrum glaciei</i>	22.50±1.44	8.75±2.39	31.25	13.75	6.13*	<0.05
9	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	12.50±1.44	8.75±3.15	21.25	3.75	0.73	0.394
10	<i>Brevundimonas diminuta</i>	18.75±3.14	15.00±3.54	33.75	3.75	0.47	0.493
11	<i>Lampropedia aestuarii</i>	18.75±2.39	16.25±2.39	35.00	2.50	0.26	0.612
12	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	20.00±2.89	21.25±2.39	41.25	-1.25	0.09	0.758
13	<i>Cedecea neteri</i>	20.00±2.04	21.25±1.25	41.25	-1.25	0.10	0.755
14	<i>Citrobacter</i> sp.	18.75±2.39	8.75±1.25	27.50	10.00	3.55	0.059
15	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	16.25±2.39	17.50±4.33	33.75	-1.25	0.12	0.732
16	<i>Leucobacter komagatae</i>	22.50±3.23	28.75±2.04	51.25	-6.25	0.69	0.405
17	<i>Gordonia iterans</i>	25.00±3.54	20.00±1.25	45.00	5.00	0.56	0.456
18	<i>Paracoccus chinensis</i>	20.00±2.89	12.50±2.50	32.50	7.50	1.49	0.223
19	<i>Sphingobacterium humi</i>	18.75±2.39	15.00±2.04	33.75	3.75	0.47	0.493
20	<i>Chryseobacterium endophyticum</i>	16.25±3.15	11.25±1.44	27.50	5.00	0.93	0.336
21	<i>Empedobacter brevis</i>	15.00±1.44	11.25±2.89	26.25	3.75	0.62	0.433

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

Notes: Data are expressed as mean ± standard error. * and ** represent significant difference at $P<0.05$ level and $P<0.01$ level, respectively, by Chi-square test.

表 4 广粪蚊成虫对 21 种共生菌发酵液的嗅觉行为反应(30 分钟)

Table 4 Olfactory behavioral responses of adult *C. fuscipes* to fermentation broths of 21 commensal bacteria (in 30 min)

序号 No.	菌种 Species	处理组引诱率 $R_{a1}/(\%)$	对照组引诱率 $R_{a2}/(\%)$	反应率 $R_r/(\%)$	相对引诱率 $R_{ra}/(\%)$	卡平方 χ^2	P 值 P value
1	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	33.75±2.39	13.75±1.25	47.50	20.00	8.33**	<0.01
2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	22.50±2.04	20.00±2.04	42.50	2.50	0.10	0.758
3	<i>Bacillus altitudinis</i>	26.25±3.15	23.75±3.75	50.00	2.50	0.08	0.777
4	<i>Bacillus pumilus</i>	20.00±3.54	18.75±3.75	38.75	1.25	0.03	0.873
5	<i>Bacillus safensis</i>	5.00±2.04	23.75±2.39	28.75	-18.75	12.45**	<0.01
6	<i>Bacillus stratosphericus</i>	20.00±3.54	18.75±4.27	38.75	1.25	0.03	0.873
7	<i>Bacillus</i> sp.	28.75±3.15	21.25±2.39	50.00	7.50	1.28	0.258
8	<i>Paenochrobactrum glaciei</i>	25.00±2.04	10.00±2.04	35.00	15.00	6.43*	<0.05
9	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	15.00±0.00	11.25±3.15	26.25	3.75	0.62	0.433
10	<i>Brevundimonas diminuta</i>	26.25±3.15	23.75±3.75	50.00	2.50	0.08	0.777
11	<i>Lampropedia aestuarii</i>	21.25±2.39	20.00±4.08	41.25	1.25	0.02	0.876
12	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	22.50±3.23	23.75±2.39	46.25	-1.25	0.02	0.884
13	<i>Cedecea neteri</i>	27.50±1.44	26.25±1.25	53.75	1.25	0.03	0.873
14	<i>Citrobacter</i> sp.	23.75±4.27	10.00±2.04	33.75	13.75	5.77*	<0.05
15	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	20.00±2.04	22.50±2.50	42.50	-2.50	0.21	0.647
16	<i>Leucobacter komagatae</i>	30.00±3.15	27.50±2.04	57.50	2.50	0.07	0.793
17	<i>Gordonia iterans</i>	26.25±2.39	20.00±2.39	46.25	6.25	0.78	0.376
18	<i>Paracoccus chinensis</i>	28.75±2.39	16.25±2.39	45.00	12.50	3.76	0.053
19	<i>Sphingobacterium humi</i>	22.50±3.23	20.00±2.04	42.50	2.50	0.21	0.647
20	<i>Chryseobacterium endophyticum</i>	23.75±2.39	15.00±3.54	38.75	8.75	1.68	0.194
21	<i>Empedobacter brevis</i>	15.00±1.44	18.75±2.04	33.75	-3.75	0.47	0.493

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

Notes: Data are expressed as mean ± standard error. * and ** represent significant difference at $P<0.05$ level and $P<0.01$ level, respectively, by Chi-square test.

在格陵兰变色杆菌发酵液挥发物中, 我们共鉴定出 114 种化合物, 其中相对含量高于 2% 的 7 种, 分别为苯甲醛(40.436%)、十二烷二腈(1,10-dicyanodecane) (13.161%)、戊醇(9.961%)、1,2-环氧十二烷(oxirane, dodecyl-) (5.082%)、二甲基二硫醚(3.032%)、4-甲基-1-苯基-2-戊酮(benzyl isobutyl ketone)(2.424%)及萘(2.424%)。

在沙福芽孢杆菌发酵液挥发物中, 我们共鉴定出 130 种化合物, 其中相对含量高于 2% 的 12 种, 分别为异戊酸乙酯(14.854%)、异戊酸异丙酯(8.537%)、萘(7.288%)、2,5-二甲基吡嗪(6.213%)、

异戊酸丁酯(butanoic acid, 3-methyl-, butyl ester) (5.911%)、二甲基二硫醚(5.421%)、2,4-二叔丁基苯酚(2,4-di-tert-butylphenol) (3.586%)及 4,6-二甲基嘧啶(pyrimidine, 4,6-dimethyl-) (2.593%)等。

3 讨论

嗅觉行为反应的测试结果表明, 在广粪蚊提取的 16 属 21 种可培养共生菌中, 4 种共生菌的发酵液可引起宿主显著的嗅觉行为反应, 其中, 水生产碱菌、柠檬酸杆菌未知种和格陵兰变色杆菌的发酵液在测试时间内对宿主成虫表现出了显

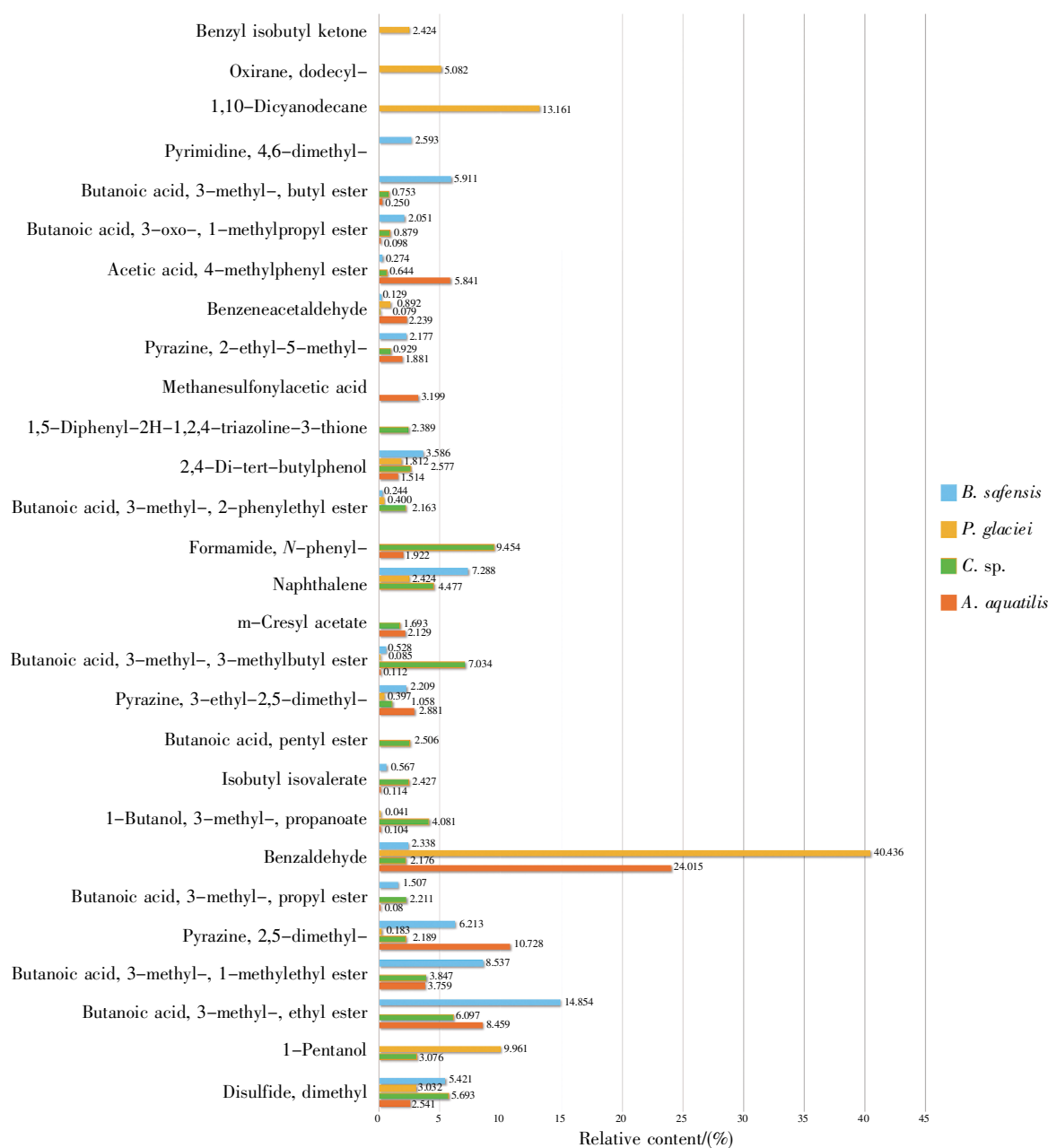


图 2 4 种共生菌发酵液的挥发物主要成分对比(相对含量 > 2%)

Fig.2 Comparison of volatile components in fermentation broths of 4 symbiotic bacteria (relative content > 2%)

著的引诱作用,而沙福芽孢杆菌的发酵液对宿主成虫具有显著的趋避作用(图1);其余17种共生菌的发酵液并不能引起宿主显著的嗅觉行为反应。Hadapad等^[20]和Noman等^[21]的研究发现,柠檬酸杆菌属共生菌的发酵液对瓜实蝇与橘小实蝇具有很强的引诱作用,这与本研究的结果相一致。另外,相关研究报道,克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、普罗旺斯菌属(*Providencia*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的多种共生菌对其昆虫宿主也具有显著的引诱作用^[15-17]。结合已有文献,本文发现的变色杆菌属与产碱菌属的发酵液对粪蚊科宿主具有显著引诱作用则是首次被报道。目前,共生菌发酵液对宿主的趋避作用研究相对较少。林嘉等^[16]和Piper等^[22]发现,葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、人类假柠檬酸盐杆菌(*Pseudocitrobacter anthropi*)、赫尔曼亚特兰大杆菌(*Atlantibacter hermannii*)的发酵液对昆士兰果蝇(*Bactrocera tryoni*)与橘小实蝇具有显著的趋避作用。本研究发现,沙福芽孢杆菌发酵液对广粪蚊具有显著趋避作用,但是,前人对芽孢杆菌属共生菌的研究发现其对宿主昆虫主要具有较强的引诱作用^[23-24],Wang等^[23]发现蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)发酵液对橘小实蝇存在较强的引诱作用,van Neerbos等^[24]则发现短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)发酵液对多种蚜虫与寄生蜂存在较强的引诱作用,这与本研究的结果存在差异,在本研究中短小芽孢杆菌发酵液并没有引起广粪蚊显著的嗅觉行为,且沙福芽孢杆菌发酵液对广粪蚊产生了显著的趋避作用。

共生菌发酵液释放的挥发物是引起昆虫嗅觉行为的直接原因。相关报道指出,可引起昆虫显著嗅觉行为的共生菌发酵液的挥发物一般含有较高水平的酯类、醛类、醇类及含氮化合物^[20-21],这与本研究的结果一致,本研究中占据前3位的挥发物成分也分别是酯类、醛类和含氮化合物(图2)。在具显著引诱作用的3种共生菌发酵液挥发物中,相对含量最高的是酯类物质,其包括异戊酸异戊酯、丙酸异戊酯、乙酸对甲酚酯等,这与一些学者的研究相似,例如:Piper等^[22]发现,对昆士兰果蝇具有引诱作用的共生菌发酵液挥发物中含量最高的化合物也是酯类物质,其中,乙酸异戊酯(isoamyl acetate)、乙酸苯乙酯(phenethyl acetate)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、乙酸异丁酯(isobutyl acetate)等物质含量较高。其次是醛类物质,其中苯甲

醛的相对含量最高,这在一些植物源引诱试验中也有发现,如:在能够吸引翅斑果蝇(*Drosophila suzukii*)的树莓和樱桃挥发物中,苯甲醛的相对含量较高^[25]。除酯类与醛类外,含氮化合物也是吸引昆虫的关键物质之一。本研究发现,在可引诱宿主的水生产碱菌发酵液的挥发物中,2,5-二甲基吡嗪与3-乙基-2,5-二甲基吡嗪的相对含量较高;在柠檬酸杆菌未知种发酵液的挥发物中,*N*-苯基甲酰胺的相对含量较高;在格陵兰变色杆菌发酵液的挥发物中,十二烷二腈的相对含量较高。一些学者发现,源自共生菌发酵液挥发物中的氨(ammonia)、吲哚(indole)、三甲胺(trimethylamine)、1-吡咯啉(1-pyrroline)、2-甲基丁胺(2-methylbutylamine)、2,3,4,5-四氢吡啶(2,3,4,5-tetrahydropyridine)、吡嗪(pyrazine)、2,5-二甲基吡嗪、3-甲基吡嗪(3-methylpyrazine)、异戊胺(isopentylamine)等含氮化合物均对宿主具有引诱作用^[14, 26-27]。共生菌发酵液对宿主的趋避作用研究相对较少,与3种具有显著引诱作用的共生菌相比,本研究中沙福芽孢杆菌的发酵液挥发物在酯类、醛类以及含氮化合物的种类与相对含量上均存在较大差异,如:在沙福芽孢杆菌发酵液的挥发物中,异戊酸丁酯、异戊酸乙酯及异戊酸异丙酯等的含量均高于其他3种共生菌。

总的来讲,本研究通过Y型嗅觉仪测试发现了可以引起广粪蚊成虫显著嗅觉行为反应的4种共生菌,并通过GC-MS分析了4种共生菌发酵液挥发物中的主要成分,这为开发绿色新型的广粪蚊引诱剂或趋避剂提供了前期数据基础。

目前,针对共生菌发酵液中挥发物对广粪蚊嗅觉行为的研究仍存在较大空白,且共生菌发酵液的挥发物对宿主行为的影响是一个较为复杂的过程,多种挥发物成分的混合也可能产生新的效应,因此将本研究所发现的共生菌发酵液挥发物中的有效成分应用到害虫防治中,仍需要开展进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 杨定,李竹,刘启飞,等.中国生物物种名录:第二卷 动物昆虫(V) 双翅目(1) 长角亚目[M].北京:科学出版社(YANG Ding, Li Zhu, Liu Qifei, et al. Species Catalogue of China, Volume 2, Animals, Insecta (V), Diptera: Nematocera[M]. Beijing: Science Press), 2020: 11.
- [2] 张超逸.沈阳地区平菇主要害虫种类调查和发生规律研究[D].沈阳:沈阳大学(ZHANG Chaoyi. The Main Pest Species and Dynamic Regularity of Oyster Mushroom in Shenyang Area[D]. Shenyang: Shenyang University), 2017.

- [3] 李光强. 食用菌害虫优势种生物学、种群动态和群落特征的研究[D]. 泰安: 山东农业大学(LI Guangqiang. Researches on Bionomics and Population Dynamics of the Dominant Edible Fungus Insect Pests and Characteristics of the Insect Communities on Main Edible Fungi[D]. Taian: Shandong Agricultural University), 2009.
- [4] 王丹丹. 广粪蚊内共生菌多样性研究[D]. 沈阳: 沈阳大学(WANG Dandan. Diversity of Symbiotic Bacteria in *Cobolidia fuscipes* (Meigen)[D]. Shenyang: Shenyang University), 2022.
- [5] EVANS J D, ARMSTRONG T N. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease[J]. *BioMed Central Ecology*, 2006, 6: 4.
- [6] HEDGES L M, BROWNLIE J C, O'NEILL S L, *et al.* *Wolbachia* and virus protection in insects[J]. *Science*, 2008, 322(5902): 702.
- [7] KAISER W, HUGUET E, CASAS J, *et al.* Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, 277(1692): 2311–2319.
- [8] WONG A C N, DOBSON A J, DOUGLAS A E. Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(11): 1894–1901.
- [9] 范海伟. 基因组学分析揭示褐飞虱与体内共生微生物的共生关系[D]. 杭州: 浙江大学(FAN Haiwei. The Genomic Analysis Reveals the Symbiotic Relationship Between the Brown Planthopper and Its Endosymbionts[D]. Hangzhou: Zhejiang University), 2015.
- [10] CEJA-NAVARRO J A, VEGA F E, KARAOZ U, *et al.* Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7618.
- [11] XIA X F, GURR G M, VASSEUR L *et al.* Metagenomic sequencing of diamondback moth gut microbiome unveils key holobiont adaptations for herbivory[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 663.
- [12] ITOH H, TAGO K, HAYATSU M, *et al.* Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(5): 434–454.
- [13] 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(WANG Sibao, QU Shuang. Insect symbionts and their potential application in pest and vector-borne disease control[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*), 2017, 32(8): 863–872.
- [14] ROBACKER D C, FLATH R A. Attractants from *Staphylococcus aureus* cultures for Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, 21(11): 1861–1874.
- [15] LUO M J, ZHANG H H, DU Y G, *et al.* Molecular identification of cultivable bacteria in the gut of adult *Bactrocera tau* (Walker) and their trapping effect[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(12): 2842–2850.
- [16] 林嘉, 蔡普默, 张贺贺, 等. 橘小实蝇雌虫对其肠道共生菌发酵液的嗅觉行为反应[J]. 中国生物防治学报(LIN Jia, CAI Pu-mo, ZHANG Hehe, *et al.* The olfactory behavioral response of *Bactrocera dorsalis* females to fermented solution of their gut endosymbionts[J]. *Chinese Journal of Biological Control*), 2019, 35(6): 891–899.
- [17] RAZA M F, YAO Z C, BAI S, *et al.* Tephritidae fruit fly gut microbiome diversity, function and potential for applications[J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2020, 110(4): 423–437.
- [18] HENNEKEN J, FARNIER K, CUNNINGHAM J P. A synthetic blend of fruit and live yeast odours shows promise for trapping mated female Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, in the field[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2022, 48(11/12): 817–826.
- [19] 薛明, 袁林, 徐曼琳. 韭菜迟眼蕈蚊成虫对挥发性物质的嗅觉反应及不同杀虫剂的毒力比较[J]. 农药学报(XUE Ming, YUAN Lin, XU Manlin. The olfactory response of adults to volatiles and compare of toxicity of different insecticides to the adults and larvae of *Bradysia odoriphaga*[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*), 2002, 4(2): 50–56.
- [20] 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.
- [21] NOMAN M S, LIU L, BAI Z, *et al.* Tephritidae bacterial symbionts: potentials for pest management[J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2020, 110(1): 1–14.
- [22] 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.
- [23] WANG H X, 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): 80–87.
- [24] VAN NEERBOS F A C, DEWITTE P, WÄCKERS F, *et al.* Bacterial volatiles elicit differential olfactory responses in insect species from the same and different trophic levels[J]. *Insect Science*, 2023, 30(5): 1464–1480.
- [25] 陈晓旭, 王珏, 晏文峰, 等. 斑翅果蝇对寄主果实及其挥发物嗅觉趋性的研究[J]. 植物保护(CHEN Xiaoxu, WANG Jue, YAN Wenfeng, *et al.* Olfactory taxis of *Drosophila suzukii* to host fruit and volatiles of host fruit[J]. *Plant Protection*), 2023, 49(6): 55–62.
- [26] SAJAN J V, SUBRAMANIAN S, SHARMA K. Attractancy potential of bacterial volatiles from symbiotic bacteria of wild population of *Zeugodacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae)[J]. *Phytoparasitica*, 2022, 50(2): 411–421.
- [27] ROBACKER D C, BARTELT R J. Chemicals attractive to Mexican fruit fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Cultures sampled by solid-phase microextraction[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(12): 2897–2915.