

桃蛀螟对青霉菌侵染苹果的产卵选择与行为趋向反应

石霞^{1,2} 艾莹婷² 石芮竹² 张民照² 王海香^{1*} 杜艳丽^{2*}

(1. 山西农业大学林学院, 太谷 030801; 2. 北京农学院植物科学技术学院,
植物生产国家级实验教学示范中心, 北京 102206)

摘要: 为探明桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 偏好于在青霉菌 *Penicillium* 侵染的苹果上产卵的特点与机理, 从苹果、玉米和柑橘上分离、纯化获得 15 株青霉菌, 通过形态学和 rDNA-ITS 序列分析鉴定后, 以健康苹果为对照, 测试不同青霉菌菌株侵染的苹果对桃蛀螟产卵选择的影响, 并利用四臂嗅觉仪测试桃蛀螟对青霉菌诱导的苹果挥发物的行为趋向反应。结果表明, 15 株青霉菌分别属于皮落青霉 *P. crustosum*、橘青霉 *P. citrinum*、苏门答腊青霉 *P. sumatrense* 和指状青霉 *P. digitatum* 的不同株型; 桃蛀螟对其中的 12 株青霉菌侵染的苹果的产卵选择率均极显著高于健康苹果, 尤其对皮落青霉 CO5 菌株、苏门答腊青霉 OR3 菌株和指状青霉 OR5 菌株侵染的苹果的产卵选择率最高, 分别达到 67.73%、61.50% 和 68.39%; 桃蛀螟对感染皮落青霉 CO5 菌株和指状青霉 OR5 菌株的苹果挥发物的选择率分别为 31.37% 和 29.19%, 均显著高于对感染橘青霉 OR1 菌株和苏门答腊青霉 OR3 菌株的苹果挥发物的选择率 18.14% 和 21.31%, 且前二者之间、后二者之间均无显著差异。表明青霉菌可通过影响寄主植物挥发物释放, 从而影响桃蛀螟对寄主植物的产卵选择和行为趋向反应。

关键词: 桃蛀螟; 苹果; 青霉菌; 产卵选择; 行为趋向反应

Oviposition selection and behavioral tendency of yellow peach moth *Conogethes punctiferalis* (Guenée) to *Penicillium*-inoculated apples

Shi Xia^{1,2} Ai Yingting² Shi Ruizhu² Zhang Minzhao² Wang Haixiang^{1*} Du Yanli^{2*}

(1. College of Forestry, Agricultural University of Shanxi, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Plant Production Education, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: To illustrate the characteristics and mechanisms of oviposition preference of yellow peach moth *Conogethes punctiferalis* (Guenée) for *Penicillium*-inoculated apples, 15 *Penicillium* strains were isolated from apples, corns and oranges, and identified by morphological and molecular characters (sequences of rDNA-ITS). The attractiveness of apples infected by each *Penicillium* strain to *C. punctiferalis* was tested using oviposition selection, with healthy apples as control, and the behavioral tendency of *C. punctiferalis* to volatiles emitted from the apples infected by different *Penicillium* species was tested using four-arm olfactometer. The results showed that the 15 *Penicillium* strains belonged to *P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. sumatrense* and *P. digitatum*, respectively. The oviposition selection rates of *C. punctiferalis* on the apples infected by 12 of the 15 *Penicillium* strains were significantly higher than those on healthy apples. Especially, the oviposition selection rates on the apples infected by the strains of *P. crustosum* CO5, *P. sumatrense* OR3 and *P. digitatum* OR5 reached 67.73%, 61.50% and 68.39%, respectively. The results of the behavioral tendency test showed that the selection rates of *C. punctiferalis* for *P. crustosum* CO5- (31.37%) and *P. digitatum* OR5-infected (29.19%) apples were both signifi-

基金项目: 北京市科技新星交叉计划(Z171100001117130), 北京市自然科学基金(6172005)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: whx25@126.com, yanlidu@126.com

收稿日期: 2018-06-28

cantly higher than those for *P. citrinum* OR1- (18.14%) and *P. sumatrense* OR3-infected (21.31%) apples. However, the selection rates between *P. crustosum*- and *P. digitatum*-infected apples, as well as between *P. citrinum*- and *P. sumatrense*-infected apples, were not significantly different. It was suggested that *Penicillium* fungi could exert influence on the oviposition selection and behavioral tendency of *C. punctiferalis* to host plants, via affecting the emission of host plant volatiles.

Key words: *Conogethes punctiferalis*; apple; *Penicillium*; oviposition selection; behavior tendency

植物与昆虫的相互作用是多方面的。在长期的协同进化过程中,植物与昆虫之间形成了各种广泛而微妙的相互作用关系,其中最重要的一个方面是昆虫选择植物作为食物和生长场所(钦俊德和王琛柱,2001)。植食性昆虫对寄主植物的选择依赖于视觉、嗅觉、味觉和触觉等感觉作用,但处于首要地位的是昆虫对植物挥发物的嗅觉作用(周琼和梁广文,2001)。近年来,有研究表明植物与昆虫的相互作用还会受到微生物的影响,即昆虫可通过嗅觉感受到被微生物侵染的植物所释放的挥发物(Davis et al., 2013),并表现出一定的趋向反应(Chaudhury et al., 2010)或驱避反应(Hughes et al., 2011),而感染微生物的植物所释放的挥发物与健康植物往往不同,这种因感染微生物而导致的植物挥发物变化可被植食性昆虫识别并用于寻找和定位寄主。如 Witzgall et al. (2012)从苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 幼虫体内分离出一种酵母菌 *Metschnikowia* sp.,发现苹果被这种酵母菌感染后可吸引苹果蠹蛾前来产卵,且雌成虫在感染酵母菌的苹果上的落卵量显著高于在健康苹果上的。可见,微生物可通过改变植物挥发物的释放而影响植物与昆虫之间的相互作用。

桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (Guenée) 是一种典型的杂食性和钻蛀性害虫,其寄主植物包括苹果、玉米、板栗等40多种果树和农作物(鹿金秋等, 2010)。前期研究表明,桃蛀螟主要通过识别植物释放的挥发物来寻找和定位寄主(陈炳旭等, 2010; Luo & Honda, 2015; Du et al., 2016)。同时,也有研究证明,微生物可以通过改变植物挥发物的释放而影响桃蛀螟与植物间的相互作用,如 Honda et al. (1988)发现桃蛀螟雌蛾在被青霉菌 *Penicillium* sp.、枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*、栗疫菌 *Endorhiza parasitica* 和番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 侵染的苹果上的落卵量显著高于在健康苹果上的。本课题组在前期预试验中也发现,桃蛀螟对感染青霉菌的苹果也具有显著的产卵选择偏好性(未发表),即被青霉菌侵染的苹果可引诱桃蛀螟前来产卵。可见,研究和利用青霉菌侵染的苹果及其释放的挥发物来诱杀桃蛀螟具有一定的理论

和实践意义。然而,青霉菌属病原菌种类繁多,是否不同种类的青霉菌侵染的苹果都会引发桃蛀螟的趋向行为和产卵选择反应,且反应程度有无差异尚不明确。因此,本试验在从桃蛀螟寄主植物苹果、玉米和柑橘上分离和纯化出多种青霉菌株系的基础上,将不同青霉菌菌株接种到苹果上,通过产卵选择试验和嗅觉行为趋向反应测试,研究感染不同青霉菌的苹果对桃蛀螟行为的影响,明确青霉菌影响桃蛀螟选择寄主的方式与特点,以期利用化学生态学原理监测和防控桃蛀螟提供理论基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及培养基:桃蛀螟寄主植物苹果、玉米和柑橘均购于北京农学院市场,健康苹果用于趋向行为试验,部分果实感染青霉菌后参照张德珍等(2016)方法分离纯化获得15株青霉菌。其中,4株分离自饲养过桃蛀螟的苹果中,菌株编号为AP1、AP2、AP3和AP4,5株分离自饲养过桃蛀螟的玉米中,菌株编号为CO1、CO2、CO3、CO4和CO5,6株分离于自然发病的柑橘中,菌株编号为OR1、OR2、OR3、OR4、OR5和OR6。各菌株分离后均以马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基培养。PDA培养基:马铃薯200 g、加葡萄糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL。

供试昆虫:所用试虫均来自北京农学院植物保护系多年来建立的桃蛀螟实验种群,已累计饲养70代左右,在人工气候箱内用鲜玉米饲养,温度为 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $(75\pm 5)\%$ 、光周期为16 L:8 D。饲养方法参照杜艳丽等(2012)。

试剂及仪器:真菌基因组DNA快速提取试剂盒,北京艾德来生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。482 mm×596 mm火鸡袋,美国Reynolds公司;RTOP-B型人工气候箱,浙江托普仪器有限公司;HPS-250型生化培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;Bio-Rad PCR仪,美国Bio-Rad公司;XB-K-25型血球计数板,浙江省玉环县求精医用仪器厂;QC-1S型大气采样仪,北京劳动保护科学研究

所;0~1 000 mL气体流量计,广州蓝林机电设备有限公司;四臂嗅觉仪,主臂长5.0 cm、内径2.5~3.0 cm,侧臂长20.0 cm、内径2.5~3.0 cm,北京康达顺业科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的形态学鉴定

将上述分离纯化的15株青霉菌菌株分别用PDA培养基于 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养7 d后,观察菌落形态特征。用载片培养法(方中达,1979)将培养好的各菌株点接于滴有25 μL 加热融化后的PDA培养基的载玻片上,盖上盖玻片后轻压培养基至厚度为1 mm左右,置于培养皿内, 28°C 恒温培养2~4 d后镜检,观察分生孢子的显微形态。每个培养基观察15个视野,共测量5~8个分生孢子的大小。

1.2.2 菌株的rDNA-ITS分子标记法鉴定

15株青霉菌菌株的DNA提取依照真菌基因组DNA快速提取试剂盒说明书进行,rDNA-ITS片段PCR扩增的50 μL 反应体系为:真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')各1.0 μL 、 $2\times\text{Taq Mix ES}$ 25.0 μL 、ddH₂O 21.3 μL 、DNA模版1.7 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,40个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min。扩增产物用0.75%琼脂糖凝胶电泳检测,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序所得序列在NCBI数据库进行BLAST比对后,用Mega 5.0软件进行遗传关系和系统发育分析,系统发育树的构建采用邻接法,并用自举法(bootstrap)对系统树进行1 000次重复检验。

1.2.3 菌株的致病性检测

从各菌株培养皿中挑取适量分生孢子置于装有1 mL无菌水的EP管中,涡旋振荡后用血球计数板计数,通过梯度稀释法配成浓度为 8×10^7 个/mL的孢子悬浮液备用。取大小相近、健康无损伤的苹果,用脱脂棉蘸取75%酒精擦洗苹果表面3次后,于超净工作台紫外杀菌30 min。用直径6 mm的打孔器在苹果肩部对称打4个深度为2 mm的圆孔,取上述孢子悬浮液30 μL 接入圆孔中,于28 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养7 d,逐日观察记录发病症状,以鉴别苹果是否被这些真菌感染,只有在苹果感染真菌后,其释放的挥发物才被认为是苹果与真菌的互作产物。

1.2.4 桃蛀螟的产卵选择试验

分别将成功接种15株青霉菌孢子悬浮液并培养6~8 d的苹果与健康苹果(对照)两两组合,测试桃蛀螟的产卵选择。随机挑选健康活泼的3~5日龄

已交配雌蛾10头、雄蛾15头置于40 cm $\times$ 35 cm $\times$ 35 cm养虫笼内,以6%~8%的蜂蜜水饲喂成虫,虫笼对角线方向分别放置2个健康苹果和2个接种同一菌株的苹果,苹果外包有棉纱布以供雌虫在其上产卵并屏蔽苹果本身视觉刺激所造成的影响。每天16:00左右收集和更换棉纱布,并顺时针调换苹果位置。待棉纱布上的卵发育为红色后,即产卵2~3 d后,开始统计每块棉纱布上的落卵量并计算产卵选择率。每个组合重复4~8次。产卵选择率=染菌苹果或健康苹果上的落卵量/总产卵量 $\times 100\%$ 。

1.2.5 桃蛀螟的行为趋向测试

上述产卵选择试验中,设置了桃蛀螟对每个待测菌株侵染的苹果与健康苹果间的产卵选择,所以在行为趋向反应中不再设置每个菌株侵染的苹果与健康苹果间的比较,而是利用四臂嗅觉仪同时比较桃蛀螟对4个菌种侵染后的苹果的行为趋向,以筛选出对桃蛀螟行为趋向影响最高的菌种。根据1.2.4的试验结果,从同一菌种的不同菌株中,各挑选1株侵染苹果后桃蛀螟产卵选择率最高的菌株,利用四臂嗅觉仪对这4种青霉菌侵染的苹果进行桃蛀螟嗅觉行为反应测试,试验装置如图1所示。空气经大气采样仪抽入后依次经过蒸馏水、活性炭、气味源(感染不同青霉菌的苹果分别放在1个火鸡袋内)和气体流量计,最后分别进入四臂嗅觉仪的相应侧臂内。测试过程中,气体流量约300 mL/min。鉴于桃蛀螟成虫具有昼伏夜出的习性,试验于夜间19:30—23:30进行。嗅觉仪正上方以15 W红色光源照明,每次将1头健康活泼的3~4日龄已交配雌蛾从四臂嗅觉仪的中部直管引入。为了使试虫提前适应试验环境,测试前将试虫置于该试验条件下适应2 h以上。当雌蛾爬过某侧臂1/3处并持续30 s以上视为选择此臂所连接的气味源,2 min内无反应则记为无选择。每测试10头雌蛾,更换一次嗅觉仪,用过的嗅觉仪用95%乙醇和清水冲洗并烘干。试验累计测试雌蛾300头,每次试验前顺时针调换嗅觉仪侧臂所连接的气味源,以消除位置偏差对试验结果的影响。计算桃蛀螟对某种气味的行为选择率,行为选择率=选择某种气味的累计雌蛾数/作出行为选择反应的总雌蛾数 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

试验数据利用SPSS 22.0软件进行统计分析,桃蛀螟产卵选择的差异显著性采用卡方检验,行为选择的差异显著性采用单因素方差分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

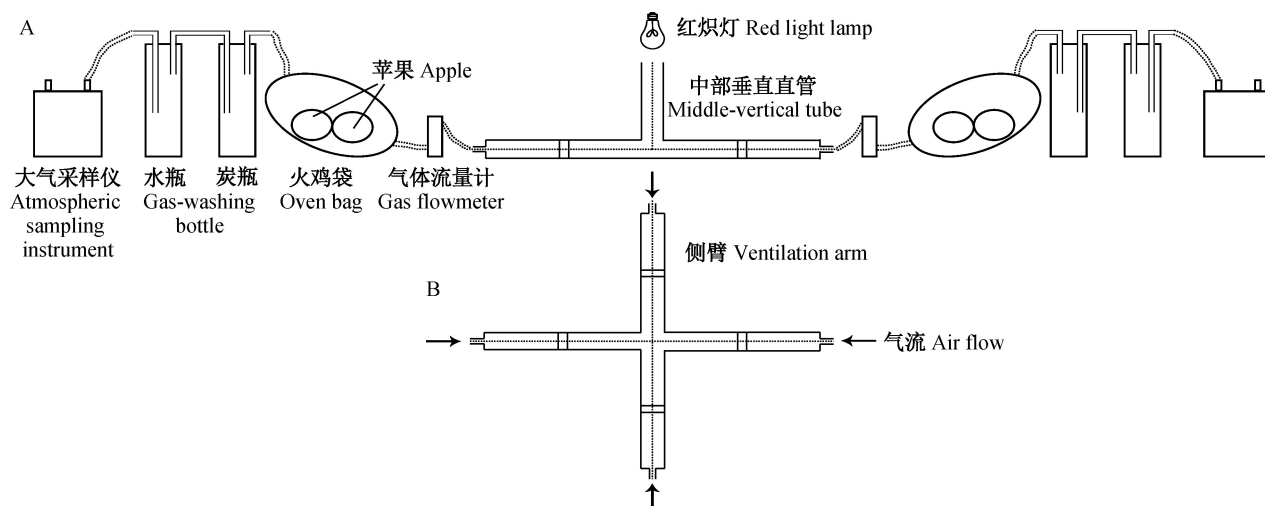


图1 本试验所用四臂嗅觉仪的装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the four-arm olfactometer in this study

A: 纵切面; B: 横切面。A: Vertical view; B: cross section.

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学鉴定

显微观察发现,从感病的苹果、玉米和柑橘中分离到的AP1、AP2、AP3、AP4、CO1、CO2、CO3、CO4、CO5和OR6这10株菌株的形态学特征基本一致:菌落正面呈绿色,背面呈橙黄色(图2-a1);帚状枝三轮生,分生孢子梗壁光滑(图2-a2)。

菌落正面呈深绿色,背面呈黄褐色(图2-b1);帚状枝双轮生,分生孢子梗壁光滑,梗基顶端呈囊状膨大(图2-b2)。菌株OR2和OR3的菌落正面呈深灰绿色,背面呈深褐色(图2-c1);帚状枝二轮生,分生孢子梗壁光滑,梗基顶端无囊状膨大(图2-c2)。菌株OR4和OR5菌落呈绒状,正面和背面均呈浅灰绿色(图2-d1);帚状枝三轮生或二轮生,不规则(图2-d2)。

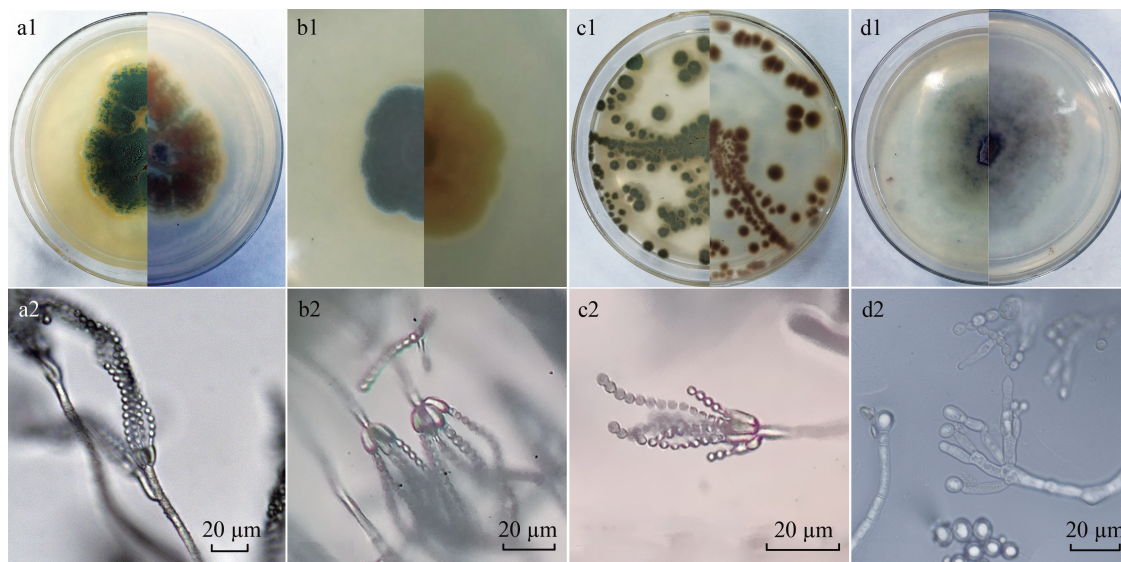


图2 本试验分离所得4株青霉菌菌株的菌落和分生孢子形态特征

Fig. 2 Colonial and conidial morphology of four isolated *Penicillium* strains in this study

a~d: 分别为菌株CO5、OR1、OR3、OR5。a1~d1: 菌落,左侧为正面,右侧为反面; a2~d2: 分生孢子。a~d: Strains CO5, OR1, OR3, OR5, respectively. a1~d1: colony; the left is the up side, and the right is the down side; a2~d2: conidia.

2.2 菌株的rDNA-ITS分子标记法鉴定

2.2.1 同源性分析结果

15株菌株的rDNA-ITS序列大小均为570 bp左

右,相互间的遗传距离为0~0.111(表1)。其中,AP1、AP2、AP3、AP4、CO1、CO2、CO3、CO4、CO5和OR6这10株菌株间的遗传距离均为0,与其它5株

菌株间的遗传距离为0.016~0.111。类似地,菌株OR2和OR3之间的遗传距离为0,与其它菌株间的遗传距离为0.043~0.082;菌株OR4和OR5之间的遗传距离为0,与其它菌株间的遗传距离为0.016~0.102;菌株OR1与其它菌株间的遗传距离较大,为0.043~0.111。

表1 本试验分离所得15株青霉菌菌株间的遗传距离
Table 1 Genetic distances among the 15 isolated *Penicillium* strains in this study

菌株 Strain	AP1	AP2	AP3	AP4	CO1	CO2	CO3	CO4	CO5	OR1	OR2	OR3	OR4	OR5
AP2	0.000													
AP3	0.000	0.000												
AP4	0.000	0.000	0.000											
CO1	0.000	0.000	0.000	0.000										
CO2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
CO3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
CO4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
CO5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
OR1	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111					
OR2	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.043				
OR3	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.043	0.000			
OR4	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.102	0.074	0.074		
OR5	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.102	0.074	0.074	0.000	
OR6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.082	0.082	0.016	0.016

2.2.2 聚类分析结果

根据同源性分析结果,从GenBank中选取与本研究中15株菌株rDNA-ITS序列相似度较高的8种青霉菌,以黄曲霉 *Aspergillus flavus* 为外群,构建系统发育树(图3)。结果显示,菌株AP1、AP2、AP3、AP4、CO1、CO2、CO3、CO4、CO5和OR6的rDNA-ITS序列与皮落青霉 *Penicillium crustosum* (登录号为KY906-187.1、LT558920.1和MG009431.1)的同源性达99%;菌株OR4和OR5与指状青霉 *Penicillium digitatum* (登录号为AY373910.1、MF527231.1和HQ850929.1)、菌株OR1与橘青霉 *Penicillium citrinum* (登录号为LT558897.1、KU687813.1、KX674625.1)、菌株OR2和OR3与苏门答腊青霉 *Penicillium sumatrense* (登录号为JX003127.1、HM595500.1和AY-213678.1)的同源性均达99%。综合15株青霉菌的形态特征、rDNA-ITS序列间遗传距离及谱系发育关系,鉴定菌株AP1、AP2、AP3、AP4、CO1、CO2、CO3、CO4、CO5和OR6为皮落青霉,菌株OR1为橘青霉,菌株OR2和OR3为苏门答腊青霉,菌株OR4和OR5为指状青霉。

2.3 菌株的致病性与发病症状

致病性测定结果显示,接种皮落青霉、橘青霉和苏门答腊青霉的苹果伤口周围均形成同心轮纹状褐色病斑圈。其中,接种皮落青霉后的第3天,苹果伤口均密布浅灰绿色霉层;第7天伤口周围呈明显水渍状(图4-a1~a2)。接种橘青霉后的第5天,苹果伤

口尚未完全布满灰绿色霉层;第7天伤口密布霉层,但水渍状不明显(图4-b1~b2)。接种苏门答腊青霉后的第5天,苹果伤口开始形成灰绿色霉层;第7天伤口有少量霉层,且水渍状不明显(图4-c1~c2)。接种指状青霉后的第7天,苹果伤口周围密布白色菌丝,但未形成侵染病斑圈(图4-d1~d2);直到第14天,其发病症状也无明显变化。说明4种青霉菌均可以侵染苹果,且皮落青霉和橘青霉对苹果的致病力明显强于苏门答腊青霉和指状青霉。为保障后续试验条件的一致性,均选择接种青霉菌7 d后的苹果开展桃蛀螟行为选择测试。

2.4 桃蛀螟对健康苹果和青霉菌侵染苹果的产卵选择

桃蛀螟对感染皮落青霉(菌株AP1、AP3、AP4、CO1、CO2、CO3和CO5)、橘青霉(菌株OR1)、苏门答腊青霉(菌株OR2和OR3)和指状青霉(菌株OR4和OR5)苹果的产卵选择率均极显著高于健康苹果($P<0.01$,图5)。其中,对测试的10株皮落青霉菌株而言,桃蛀螟对感染菌株CO5的苹果的产卵选择率最高,达67.73%,对感染菌株AP2的苹果的产卵选择率与健康苹果间无显著差异,但对感染菌株CO4和OR6的苹果的产卵选择率显著低于健康苹果。对苏门答腊青霉的2株菌株而言,桃蛀螟对感染菌株OR3的苹果的产卵选择率最高,为61.50%。对指状青霉的2株菌株而言,桃蛀螟对感染菌株OR5的苹果的产卵选择率最高,为68.39%。

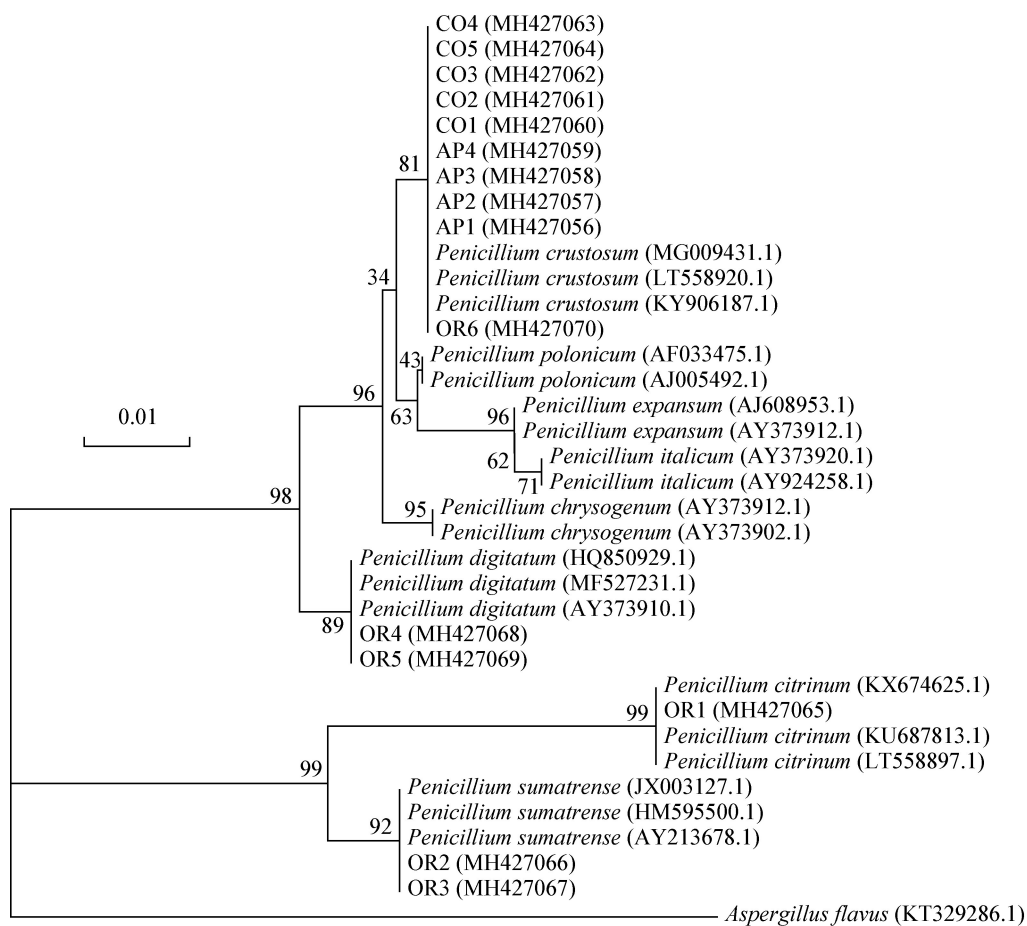


图3 基于rDNA-ITS序列采用邻接法构建15株青霉菌株与其它相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 15 strains of *Penicillium* sp. and other related strains based on rDNA-ITS sequences by neighbor-joining method

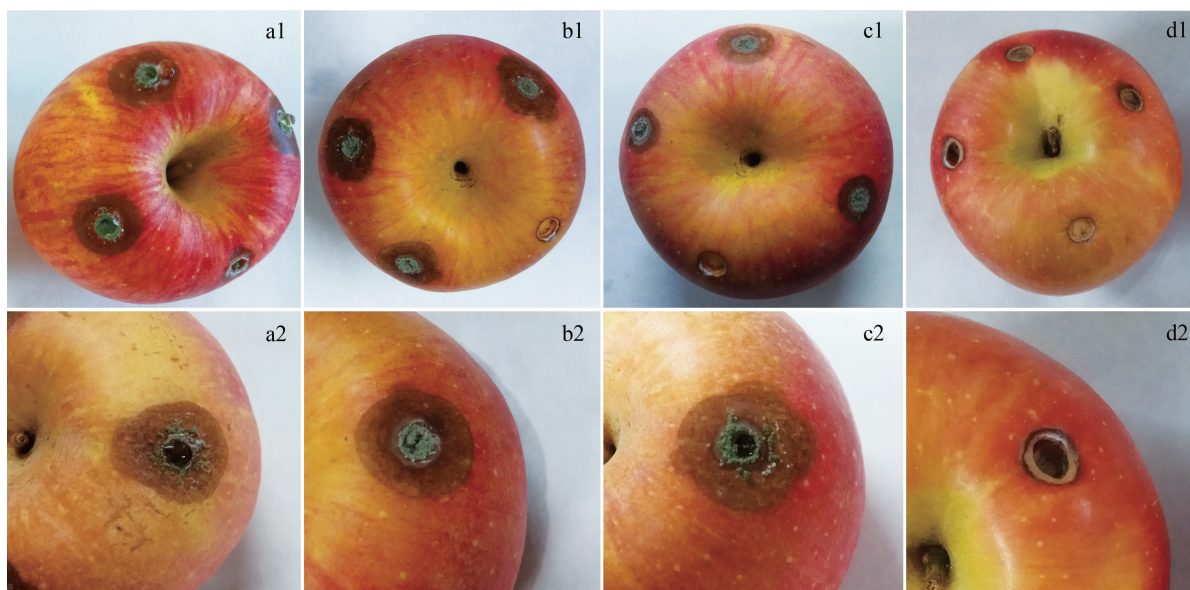


图4 苹果接种不同青霉菌第7天后的发病症状

Fig. 4 Pathogenicity of *Penicillium*-inoculated apples on the 7th day

a: 皮落青霉菌株 AP2; b: 橘青霉菌株 OR1; c: 苏门答腊青霉菌株 OR3; d: 指状青霉菌株 OR4. a1~d1: 整体情况; a2~d2: 局部放大. a: *P. crustosum* AP2; b: *P. citrinum* OR1; c: *P. sumatrense* OR3; d: *P. digitatum* OR4. a1~d1: whole symptom; a2~d2: partial symptom.

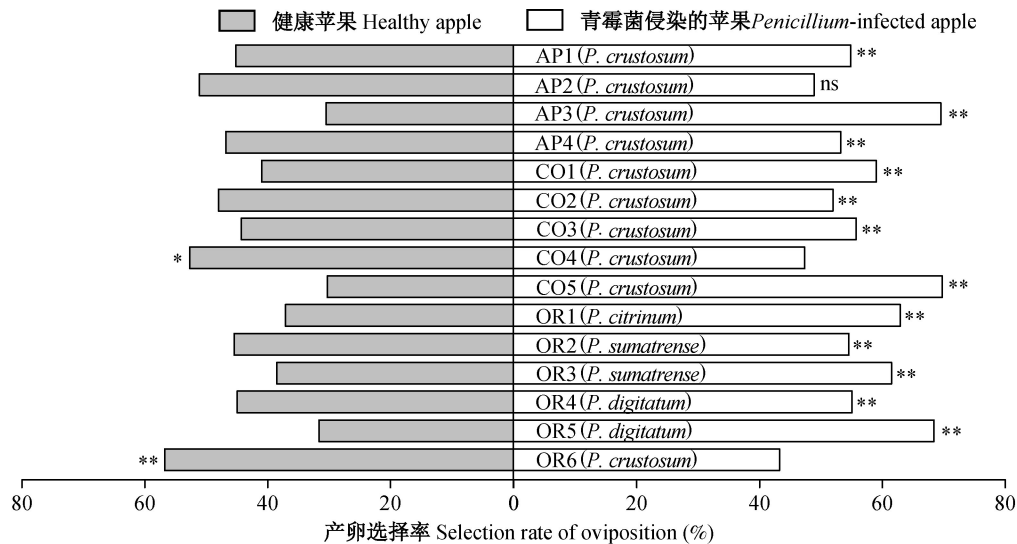


图5 桃蛀螟对健康苹果和青霉菌感染的苹果的产卵选择率

Fig. 5 Oviposition selection of *Conogethes punctiferalis* to healthy apples and *Penicillium*-infected apples

**和*分别表示经卡方检验在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著, ns 表示差异不显著。 ** or * indicates significant differences at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by χ^2 test, respectively; ns indicates no significant difference by χ^2 test.

2.5 桃蛀螟对4种青霉菌的行为趋向反应

根据产卵选择结果, 菌株CO5、OR1、OR3和OR5分别为皮落青霉、橘青霉、苏门答腊青霉和指状青霉中引起桃蛀螟对感染后的苹果产卵选择率最高的菌株。因此, 这4株菌株感染的苹果被进一步用于桃蛀螟嗅觉行为反应测试。桃蛀螟对感染4种青霉菌苹果的选择率差异显著($P<0.05$, 图6)。其中, 对感染皮落青霉CO5菌株(31.37%)和指状青霉OR5菌株(29.19%)苹果的选择率均显著高于感染橘青霉OR1菌株(18.14%)和苏门答腊青霉OR3菌株(21.31%)苹果的选择率, 但前二者、后二者之间均无显著差异。

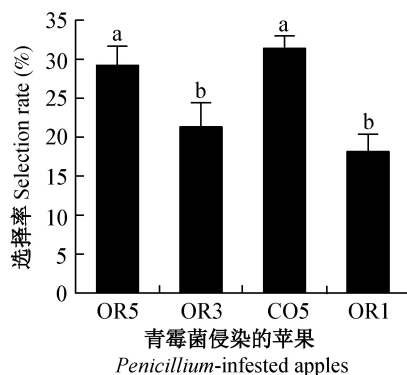


图6 桃蛀螟对不同青霉菌感染的苹果的行为趋向反应

Fig. 6 Behavioral tendency of *Conogethes punctiferalis* to the odor of *Penicillium*-infested apples

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。 Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本研究将真菌的形态学特征与rDNA-ITS序列分析相结合, 鉴定出所分离纯化的15株菌株分别为皮落青霉、橘青霉、苏门答腊青霉和指状青霉。其中, 皮落青霉的分生孢子梗壁显著刺状粗糙; 橘青霉和苏门答腊青霉的分生孢子梗均光滑, 但前者的梗基顶端呈囊状膨大, 而后的不膨大; 指状青霉的分生孢子为椭圆形或圆柱状, 与其它菌种的球形或近球形不同, 且分生孢子也明显大于其它菌种(孔华忠, 2007; 郑雅娴和吕文华, 2015)。所鉴定的这4种青霉菌与 GenBank 中已有的相关序列的同源性均达99%, 分子鉴定结果与形态鉴定结果相一致; 另外, 4种青霉菌的rDNA-ITS序列间的遗传距离为0.016~0.111, 同一菌种的不同菌株间的遗传距离为0, 说明不同青霉菌种间遗传差异较大, 而同种菌不同菌株间的遗传差异较小, 之前有关镰刀菌 *Fusarium* sp.、辣椒疫霉菌 *Trichoderma* sp. 等的研究也认为不同菌种间的遗传距离要大于同一菌种不同菌株间的遗传距离(贺字典等, 2010; 张亭亭等, 2011)。

在昆虫复杂的化学感受系统中, 尽管味觉、触觉和视觉均可调节昆虫的行为, 但嗅觉是最主要的感受途径(Davis et al., 2013), 在其觅食、求偶、选择和定位寄主的行为过程中起着重要作用(Davis & Landolt, 2013; Du et al., 2016), 生产中可依据此原理利用信息化合物对农林害虫进行诱杀(Welter et al., 2005; Witzgall et al., 2008; 杜艳丽等, 2014)。桃蛀螟是一种典型的钻蛀性害虫, 有研究发现其雌

蛾喜欢在感染青霉菌的苹果上产卵,推测青霉菌诱导的苹果挥发物是吸引桃蛀螟前来产卵的主要因素(Honda et al., 1988)。本研究将供试苹果用棉纱布包裹,排除了味觉、触觉和视觉因素对桃蛀螟行为的干扰,从而保障了嗅觉在桃蛀螟产卵选择过程中的重要作用。与健康苹果相比,桃蛀螟在感染皮落青霉、橘青霉、苏门答腊青霉和指状青霉的苹果上的累积落卵量均极显著高于健康苹果,说明被青霉菌感染的苹果对桃蛀螟有更强的引诱作用,进一步证实了Honda et al. (1988)的研究结果,即与健康苹果相比,桃蛀螟更喜欢在青霉菌侵染的苹果上产卵。然而,试验中也发现桃蛀螟对感染同一菌种不同菌株的苹果的选择行为有所差异,如对皮落青霉而言,桃蛀螟在感染菌株AP2的苹果上的落卵量与健康苹果无显著差异,在感染菌株CO4和OR6的苹果上的落卵量均显著低于健康苹果,这一方面是由于菌株间的遗传分化,使得苹果感染真菌后产生的挥发物有所不同(高苇等, 2011; Nawrath et al., 2012);另一方面,菌株OR6是从自然感病柑橘上分离得到的,而其它9株皮落青霉菌株均分离自桃蛀螟幼虫取食过的玉米或苹果,因此,推测桃蛀螟对这9株菌株诱导寄主所产生的挥发物具有学习和记忆能力,使得成虫倾向于在其上产卵(Faber et al., 1999; Giurfa, 2013);当然,也有可能因为分离自玉米和苹果上的皮落青霉是桃蛀螟幼虫肠道微生物中的一种,对其生长发育非常重要(Herrera et al., 2008; Raguso, 2008)。昆虫-寄主-微生物间的这种互作关系在苹果蠹蛾中也曾有过报道(Witzgall et al., 2012)。

近年来,一些研究通过对微生物的代谢产物和nrITS序列进行分析后,认为挥发物的化学指纹图谱与DNA条形码一样,可用于微生物的分类鉴定与亲缘关系分析(Karlshoj & Larsen, 2005; Xu et al., 2017)。本研究中4个菌种的聚类分析图显示橘青霉和苏门答腊青霉聚在一个大分支中,皮落青霉与指状青霉亲缘关系较近,推测橘青霉与苏门答腊青霉的挥发物较皮落青霉与指状青霉更相似。四臂嗅觉仪行为反应测试结果也表明,桃蛀螟雌蛾对皮落青霉和指状青霉诱导的苹果挥发物的选择率显著高于对橘青霉和苏门答腊青霉诱导的苹果挥发物的选择率,且前二者之间、后二者之间均无显著差异。综合前期研究中有关微生物种间谱系发育关系与其挥发物之间的对应关系,以及本研究中桃蛀螟对4种真菌侵染的苹果挥发物的行为反应测试结果,推测微生物种间亲缘关系越近,不但其自身代谢产物更相似,且其与寄主互作后所释放的挥发性化合物图谱也更相

似。对于昆虫而言,根据“mother knows best”理论,雌性成虫一般在有利于其后代生长发育的寄主植物上产卵(Bernays & Graham, 1988; García-Robledo & Horvitz, 2012; Zhang et al., 2012),结合本研究中有产卵选择和行为反应的测定结果,桃蛀螟偏好感染皮落青霉和指状青霉的苹果上产卵,并对其气味有明显的趋向性,推测这2种青霉菌诱导的苹果代谢产物更有利于桃蛀螟种群的生长发育和繁殖。下一步可通过对感染这4种青霉菌苹果的挥发物进行捕集、鉴定和行为反应测试,筛选出对桃蛀螟具有较好引诱作用的诱剂配方,研发桃蛀螟田间诱捕剂用于害虫发生预测预报和综合治理;同时,可通过室内人工饲养试验,观察比较这4种青霉菌对桃蛀螟生长发育和繁殖过程中各项生理指标的影响,以进一步揭示寄主-微生物-桃蛀螟之间的互作关系。

参考文献 (References)

- Bernays E, Graham M. 1988. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology*, 69(4): 886–892
- Chaudhury MF, Skoda SR, Sagel A, Welch JB. 2010. Volatiles emitted from eight would-isolated bacteria differentially attract gravid screwworms (Diptera: Calliphoridae) to oviposit. *Journal of Medical Entomology*, 47(3): 349–354
- Chen BX, Dong YZ, Liang GW, Lu H. 2010. Effects of volatiles from chestnut on host preference of adult *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21(2): 464–469 (in Chinese) [陈炳旭, 董易之, 梁广文, 陆恒. 2010. 板栗挥发物对桃蛀螟成虫寄主选择行为的影响. *应用生态学报*, 21(2): 464–469]
- Davis TS, Crippen TL, Hofstetter RW, Tomberlin JK. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 840–859
- Davis TS, Landolt PJ. 2013. A survey of insect assemblages responding to volatiles from a ubiquitous fungus in an agricultural landscape. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 860–868
- Du YL, Guo HM, Sun SL, Zhang MZ, Zhang AH, Wang JB, Qin L. 2012. Effects of temperature on the development and reproduction of the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(5): 561–569 (in Chinese) [杜艳丽, 郭洪梅, 孙淑玲, 张民照, 张爱环, 王金宝, 秦岭. 2012. 温度对桃蛀螟生长发育和繁殖的影响. *昆虫学报*, 55(5): 561–569]
- Du YL, Zhang JX, Yan ZG, Ma YQ, Yang MM, Zhang MZ, Zhang ZY, Qin L, Cao QQ. 2016. Host preference and performance of the yellow peach moth (*Conogethes punctiferalis*) on chestnut cultivars. *PLoS ONE*, 11(6): e0157609
- Du YL, Zhang MZ, Ma YQ, Sun SL, Wang JB, Liu JL, Qin L. 2014. Formulation screening of sex pheromones and field trapping tests for the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Plant Protection*,

- 41(2): 187–191 (in Chinese) [杜艳丽, 张民照, 马永强, 孙淑玲, 王金宝, 刘建玲, 秦岭. 2014. 桃蛀螟性诱剂配方筛选与田间引诱试验. 植物保护学报, 41(2): 187–191]
- Faber T, Joerges J, Menzel R. 1999. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience*, 2(1): 74–78
- Fang ZD. 1979. Research methods of plant pathology. Beijing: Agriculture Press, pp. 108–109 (in Chinese) [方中达. 1979. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, pp. 108–109]
- Gao W, Li BJ, Shi YX, Xie XW. 2011. Studies on pathogenicity differentiation of *Corynespora cassiicola* isolates, against cucumber, tomato and eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 38(3): 465–470 (in Chinese) [高伟, 李宝聚, 石延霞, 谢学文. 2011. 多主棒孢菌在黄瓜、番茄和茄子寄主上致病力的分化. 园艺学报, 38(3): 465–470]
- García-Robledo C, Horvitz CC. 2012. Parent-offspring conflicts, “optimal bad motherhood” and the “mother knows best” principles in insect herbivores colonizing novel host plants. *Ecology and Evolution*, 2(7): 1446–1457
- Giurfá M. 2013. Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences*, 36(5): 285–294
- He ZD, Gao ZG, Gao YF, Zhao BX, Zhang XF. 2010. ITS sequence of *Trichoderma* species in soil planted vegetables in the greenhouse and UP-PCR analysis on genetic diversity. *Journal of Plant Protection*, 37(5): 459–465 (in Chinese) [贺字典, 高增贵, 高玉峰, 赵柏霞, 张小飞. 2010. 蔬菜保护地木霉菌 rDNA-ITS 序列和 UP-PCR 遗传多样性分析. 植物保护学报, 37(5): 459–465]
- Herrera CM, García IM, Pérez R. 2008. Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, 89(9): 2369–2376
- Honda H, Ishiwatari T, Matsumoto Y. 1988. Fungal volatiles as oviposition attractants for the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 34(3): 205–211
- Hughes DP, Anderson SB, Hywel-Jones NL, Himaman W, Billen J, Boomsma JJ. 2011. Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecology*, 11: 13
- Kong HZ. 2007. Flora fungorum sinicorum Vol.35: *Penicillium* et teleomorphi cognati. Beijing: Science Press, pp. 121–173 (in Chinese) [孔华忠. 2007. 中国真菌志第三十五卷: 青霉属及其相关有性型属. 北京: 科学出版社, pp. 121–173]
- Karlsboj K, Larsen TO. 2005. Differentiation of species from the *Penicillium roqueforti* group by volatile metabolite profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 708–715
- Lu JQ, Wang ZY, He KL, Liu Y. 2010. Research history, progresses and prospects in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis*. *Plant Protection*, 36(2): 31–38 (in Chinese) [鹿金秋, 王振营, 何康来, 刘勇. 2010. 桃蛀螟研究的历史、现状与展望. 植物保护, 36(2): 31–38]
- Luo ZX, Honda H. 2015. Function of plant odors in oviposition behaviors of the yellow peach moth *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Applied Entomology and Zoology*, 50(3): 347–353
- Nawrath T, Mgone GF, Weetjens B, Kaufmann SHE, Schulz S. 2012. The volatiles of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and related bacteria. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8: 290–299
- Qin JD, Wang CZ. 2001. The relation of interaction between insects and plants to evolution. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 360–365 (in Chinese) [钦俊德, 王琛柱. 2001. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系. 昆虫学报, 44(3): 360–365]
- Raguso RA. 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 549–569
- Welter SC, Pickel C, Millar J, Cave F, van Steenwyk RA, Dunley J. 2005. Pheromone mating disruption offers selective management options for key pests. *California Agriculture*, 59(1): 16–22
- Witzgall P, Proffitt M, Rozpedowska E, Becher PG, Andreadis S, Coracini M, Lindblom TUT, Ream LJ, Hagman A, Bengtsson M, et al. 2012. “This is not an apple” - yeast mutualism in codling moth. *Journal of Chemical Ecology*, 38(8): 949–957
- Witzgall P, Stelinski L, Gut L, Thomson D. 2008. Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*, 53: 503–522
- Xu M, Heidmarsson S, Thorsteinsdottir M, Eiriksson FF, Omarsdottir S, Olafsdottir ES. 2017. DNA barcoding and LC-MS metabolite profiling of the lichen-forming genus *Melanelia*: specimen identification and discrimination focusing on Icelandic taxa. *PLoS ONE*, 12(5): e0178012
- Zhang DZ, Li PC, Chen XX, Wang CX, Yu JF. 2016. Isolation and identification of the pathogens causing wheat common root rot in Shandong Province. *Journal of Plant Protection*, 43(2): 233–240 (in Chinese) [张德珍, 李鹏昌, 陈晓霞, 王彩霞, 于金凤. 2016. 山东省小麦根腐病原菌的分离鉴定. 植物保护学报, 43(2): 233–240]
- Zhang PJ, Lu YB, Zalucki MP, Liu SS. 2012. Relationship between adult oviposition preference and larval performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Pest Science*, 85(2): 247–252
- Zhang TT, Liu CY, Zhao KH, Liang CH, Guan TS, Wang H, Huang JS. 2011. Identification of phytopathogenic *Fusarium* causing pepper soil-borne diseases in Liaoning Province and sequence analysis of ribosomal DNA-ITS. *Plant Protection*, 37(5): 101–105 (in Chinese) [张亭亭, 刘长远, 赵奎华, 梁春浩, 关天舒, 王辉, 黄俊生. 2011. 辽宁省辣椒土传病害镰刀菌鉴定及 rDNA-ITS 序列分析. 植物保护, 37(5): 101–105]
- Zheng YX, Lü WH. 2015. Isolation and identification of strain fungi associated with *Daemonorops margaritae* Cane. *Journal of Northwest Forestry University*, 30(5): 219–223 (in Chinese) [郑雅娴, 吕文华. 2015. 黄藤材主要变色菌的分离和鉴定. 西北林学院学报, 30(5): 219–223]
- Zhou Q, Liang GW. 2001. The plant volatiles and their effect on host location of aphids. *Entomological Knowledge*, 38(5): 334–336 (in Chinese) [周琼, 梁广文. 2001. 植物挥发性物质在蚜虫寄主定位中的作用. 昆虫知识, 38(5): 334–336]

(责任编辑:李美娟)