取食行为对丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内可培养真菌的影响*

宋秀锋** 段入心** 王宁新***

（山东农业大学植物保护学院 山东省蔬菜病虫生物学重点实验室，泰安 271000）

摘 要 **【目的】** 本研究旨在阐明取食行为对丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*（Walker）雌雄虫体内可培养真菌群落结构的影响，对其体内可培养真菌进行多样性研究。**【方法】** 采用不同浓度、不同培养基通过分离培养法研究丽蝇蛹集金小蜂体内真菌，将培养所得真菌采用形态和分子方法（ITS 基因序列）进行鉴定。**【结果】** 取食前后丽蝇蛹集金小蜂雌、雄虫体内共分离得到 49 种真菌，隶属子囊菌门，盘菌亚门的座囊菌纲、散囊菌纲、锤舌菌纲、子囊菌纲，共 10 个属，其中以链格孢属（*Alternaria*）、枝孢属（*Cladosporium*）、青霉属（*Penicillium*）为优势属。**【结论】** 丽蝇蛹集金小蜂体内可培养真菌物种数目，雄虫多于雌虫，取食后多于取食前。本研究结果说明食物、性别是丽蝇蛹集金小蜂体内可培养真菌群落结构产生差异的重要因素。

关键词 丽蝇蛹集金小蜂，可培养真菌，取食，性别，多样性

Effect of different foods on the fungal community cultured from adult female and male *Nasonia vitripennis* (Walker)

SONG Xiu-Feng** DUAN Ru-Xin** WANG Ning-Xin***

(Shandong Provincial Key Laboratory for Biology of Vegetable Diseases and Insect Pests, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai’an 271000, China)

Abstract **[Objectives]** To clarify the effect of different foods on the fungal community of adult male and female *Nasonia vitripennis* (Walker). **[Methods]** We cultured fungi from *N. vitripennis* after feeding them with different concentration and dilution plate techniques, and different media, and quantified the results using both morphological and molecular (ITS gene) methods. **[Results]** Forty-nine different fungal species were isolated from male and female adults of *N. vitripennis* before and after feeding. These were classified into 4 classes (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Ascomycetes) and 10 genera of Ascomycota. The predominant genera were *Alternaria*, *Cladosporium* and *Penicillium*. **[Conclusion]** Males had a greater number of fungal species than females, and more fungi were cultured after feeding than before. These results indicate that food and the gender are important factors affecting fungi that can be cultured from *N. vitripennis*.

Key words *Nasonia vitripennis*, culturable fungi, feeding, gender, diversity

真菌起源于大约 10 亿年前带鞭毛的原生动物，与动物的亲缘关系非常密切（Wainright *et al.*, 1993）。昆虫作为动物界中第一大类群，与真菌在漫长的进化过程中逐渐形成了复杂而密切关系，包括了致病、寄生、互惠共生、偏利共生、携播、噬菌、竞争和捕食等（李增智，1997）。无论在昆虫的体表还是体内，都存在着丰富的真菌类群，与昆虫形成密切的关系，已经受到越来越多的关注。

目前，已经描述的真菌约为 7 万种，但科学

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31101634）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：hanhantianzi@163.com；18754801790@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：nxwang@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2016-06-25，接受日期 Accepted：2017-04-05

估计其物种数目可能在 150 万种（Hawksworth，2011）。因技术的限制，目前仅有 5%的真菌类群能被分离培养和检测到（Hawksworth and Rossman，1977）。由于昆虫体内真菌培养困难、真菌发育的多型现象以及昆虫体内真菌的趋同进化等问题，真菌的研究相比于细菌的研究具滞后性（Gibson and Hunter，2010）。

基于微生物平板培养法对昆虫体内真菌的研究具有悠久的历史，国内外有大量文献报道了不同昆虫体内可培养的真菌。研究发现在昆虫体内存在许多可培养真菌物种，并且在不同昆虫体内存在不同的可培养真菌物种（Burke，1950；Gilliam *et al.*，1972；Siti *et al.*，2000；Suh *et al.*，2005；Suh *et al.*，2008）。已有实验表明，实蝇类昆虫（Tephritidae）体内可培养真菌经鉴定为假丝酵母属（*Candida*）（柳丽君等，2011），桃小食心虫 *Carposina sasakii* Matsmura 体内可培养真菌经鉴定为镰孢菌属（*Fusarium*）和拟青霉属（*Paecilomyces*）（朱永敏等，2011）等。传统真菌鉴定方法多为形态学鉴定，工作量大且可能因同种或不同种菌株生长速度不同、外界因素干扰等给鉴定工作带来困难，使鉴定结果不准确。目前以分子技术为基础的方法逐渐应用到微生物多样性的研究中，结合分子生物学方法可增加鉴定结果的准确性、可靠性，以更全面地获取昆虫体内可培养真菌多样性信息。

丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*（Walker）隶属节肢动物门、昆虫纲、膜翅目、小蜂总科、金小蜂科、*Nasonia* 属，为世界范围内的广布种（Noyes，2002）。丽蝇蛹集金小蜂整个发育历期较短（约半月），是多种双翅目蝇类（丽蝇科、麻蝇科和蝇科等）蛹期常见的寄生蜂种类。丽蝇蛹集金小蜂为完全变态昆虫，前三个虫态（卵、幼虫、蛹）在密闭的蝇蛹中生活，仅在成虫期出蜂，接触外界环境，成虫需要补充营养后才能完成整个生长发育史（Darling and Werrn，1990）。

目前对丽蝇蛹集金小蜂体内的细菌已有研究（Brucker and Bordenstein，2012；Brucker and Bordenstein，2013），但相关真菌研究仍未见有报道。本研究以取食前后的丽蝇蛹集金小蜂雌、雄成虫为研究对象，采用多种培养基配方分离培养其体内共生真菌，根据 ITS 基因序列特征进行分子鉴定，可对其体内存在的真菌物种进行初步了解，以获得丽蝇蛹集金小蜂可培养共生真菌多样性信息，明确取食行为对丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内真菌的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试虫源 丽蝇蛹集金小蜂来源：取自山东农业大学昆虫分子生物实验室饲养的第 17、18、19、20 代丽蝇蛹集金小蜂。虫体处理：取羽化后取食一天的雌、雄活成虫，羽化后未取食的雌、雄成虫。

1.1.2 培养基的制备 PDA 培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，1 000 mL 蒸馏水。YM 培养基：葡萄糖 10 g，蛋白胨 5 g，麦芽膏（提取物）3 g，酵母提取物 3 g，琼脂 20 g，1 000 mL 蒸馏水。查氏培养基：蔗糖 30 g，$NaNO_3$ 2 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g，KCL 0.5 g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g，K_2HPO_4 1 g，1 000 mL 蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 实验材料的处理 分别选取 15 头丽蝇蛹集金小蜂雌虫、雄虫于 1.5 mL 离心管中，用 75%酒精快速杀死后，迅速用无菌水清洗 2~3 次，加入 1 mL 无菌水，在超声波清洗仪中 30 HZ、25℃条件下震荡 1.5 min（牛丽华，2013），无菌水冲洗 2 次，再次在超声波清洗仪中震荡 1.5 min，无菌水冲洗 2 次，弃去清洗液。虫体体表消毒：在超净工作台中进行，75%酒精处理虫体 1 min，无菌水冲洗 2~3 次，2.6%次氯酸钠 4~5 min，75%酒精 1 min，无菌水冲洗 2~3 次，最后一次无菌水作为对照（Suh *et al.*，2004；张建春等，2011）。

1.2.2 丽蝇蛹集金小蜂体内真菌的分离、培养

将体表消毒处理后的丽蝇蛹集金小蜂用无菌研磨棒充分研磨。用无菌水进行 10^{-1}~10^{-6} 梯度稀释，标号 1~6 号。最后一次清洗的无菌水作为对照组 0 号。每个梯度设置 2 个重复，每平板取 150 μL 稀释液均匀的涂布在培养基上，待涂布

溶液被充分吸收后进行封口。将培养基放置于 28℃、55%湿度的培养箱中培养 7~10 d。对照组 0 号无任何菌落生长则代表金小蜂表面消毒彻底。对分离培养后长出的菌株进行形态观察，同一处理同种培养基上菌体形态（菌丝长短、生长密度大小等）、颜色等明显类似的作为重复菌株排除进入下一步实验。定时观察记录，对培养基上出现的真菌进行多次纯化，分离至每个平板上只长一个菌落。

1.2.3 可培养真菌鉴定 采用 DNA 基因组提取试剂盒（全式金公司）提取 DNA，依据试剂盒步骤进行。使用通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增 ITS 片段（White *et al.*，1990）。PCR 反应条件为：95℃预变性 5 min，95℃变性 45 s，52℃退火 45 s，72℃延伸 45 s，72℃下延伸 7 min，反应液总体积为 25 μL，运行 30 个循环。反应结束后，1%琼脂糖凝胶电泳检测反应产物，溴化乙锭（EB）染色，紫外成像系统观测结果。经电泳检测后，将扩增出目的带（650 bp）的样品进行序列测定，采用引物 ITS1 进行单向测定，由上海美吉生物技术公司完成。将测序返回的序列通过 NCBI 主页进行在线 Blast 比对分析，按 99%的相似度进行菌株鉴定。

2 结果与分析

2.1 丽蝇蛹集金小蜂可培养真菌多样性

本实验从 120 头丽蝇蛹集金小蜂雌雄虫体内分离可培养的真菌共 300 株。分别提取 DNA 进行 PCR 扩增，测序结果通过 Blast 相似性达到 99%的比对分析，最终得到 49 种真菌,隶属子囊菌门（Ascomycota），盘菌亚门（Pezizomycotina）的座囊菌纲（Dothideomycetes）、散囊菌纲（Eurotiomycetes）、锤舌菌纲（Leotiomycetes）、子囊菌纲（Ascomycetes）（表 1）。

2.2 未取食的丽蝇蛹集金小蜂雌、雄成虫体内可培养真菌

丽蝇蛹集金小蜂成虫出蜂后未取食则直接分离培养体内真菌，综合 3 种培养基分离所得结果，雌雄虫体内均检测到真菌存在。雌雄成虫体内分离培养所得真菌隶属子囊菌门，盘菌亚门。其中由雌虫分离获得 14 种真菌，属于 7 个属；雄虫分离获得 15 种真菌，属于 10 个属（表 1）。除链格孢属（*Alternaria*）为雌雄虫共有优势属外，曲霉属（*Aspergillus*）为雌虫特有优势属，毛壳属（*Chaetomium*）为雄虫特有优势属。雌雄虫共同拥的有真菌物种仅 4 种（图 1），分别是小穴壳属（*Dothiorelasac.*）、黑曲霉（*Aspergillus*）、细极链格孢（*Alternaria tenuissima*）、链格孢霉（*Alternaria*）（表 1）。

2.3 取食后丽蝇蛹集金小蜂雌、雄成虫体内可培养真菌

雌雄成虫体内分离培养所得真菌隶属子囊菌门（Ascomycota），盘菌亚门（Pezizomycotina）的座囊菌纲（Dothideomycetes）、散囊菌纲（Eurotiomycetes）、锤舌菌纲（Leotiomycetes）、子囊菌纲（Ascomycetes）。其中由雌虫分离获得 23 种真菌，属于 6 个属；雄虫分离获得 24 种真菌,属于 10 个属（表 1）。除链格孢属（*Alternaria*）、青霉属（*Penicillium*）为雌、雄虫共有优势属外，毛壳属（*Chaetomium*）、曲霉属（*Aspergillus*）为雌虫特有优势属，枝孢属（*Cladosporium*）为雄虫特有优势属。丽蝇蛹集金小蜂雌雄虫共同拥有的菌种为 9 种（图 2），隶属于链格孢属（*Alternaria*）、曲霉属（*Aspergillus*）、枝孢属（*Cladosporium*）、青霉属（*Penicillium*）（表 1）。

2.4 取食前后丽蝇蛹集金小蜂雌、雄成虫体内可培养真菌物种差异

丽蝇蛹集金小蜂取食前、后雌虫和雄虫分离获得真菌物种数目存在一定差异性。成虫取食后分离所得菌种数目明显多于未取食个体分离所得结果。取食前后由雌虫分离培养所得真菌物种仅 5 种相同（图 2），分别为链格孢 *Alternaria alternata*、细极链格孢 *Alternaria tnuissima*、黄曲霉 *Aspergillus flavus*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、聚多曲霉 *Aspergillus sydowii*。雌虫取食后体内除链格孢属（*Alternaria*）、曲霉属（*Aspergillus*）

表 1 取食前后丽蝇蛹集金小蜂雌、雄虫体内可培养真菌物种

Table 1 Species of feeding on culturable fungi communities between female and male adults of *Nasonia vitripennis*

雌虫（取食前） Female before feeding	雄虫（取食前） Male before feeding	雌虫（取食后） Female after feeding	雄虫（取食后） Male after feeding
Alternaria alternata	*Alternaria alternata*	*Alternaria alternate*	*Alternaria alternata*
Alternaria tenuissima	*Alternaria tenuissima*	*Alternaria tenuissima*	*Alternaria tenuissima*
Aspergillus niger	*Aspergillus niger*	*Aspergillus niger*	*Aspergillus niger*
Alternaria sp. FFRh3	*Alternaria solani*	*Alternaria brassicae*	*Alternaria solani*
Aspergillus flavus	*Cercospora capsici*	*Alternaria compacta*	*Alternaria tamaricis*
Aspergillus oryzae	*Cladosporium cladosporioides*	*Alternaria gaisen*	*Alternaria tenuis*
Aspergillus sclerotiorum	*Cladosporium oryzae*	*Alternaria longipes*	*Aspergillus flavus*
Aspergillus sydowii	*Cladosporium oxysporum*	*Alternaria metachromatica*	*Aspergillus ochraceus*
Acremonium cellulolyticus	*Cladosporium* sp. EF5	*Alternaria ochroleuca*	*Aspergillus oryzae*
Cladosporium iridis	*Coprinopsis atramentaria*	*Alternaria solani*	*Cladosporium cladosporioides*
Coprinellus radians	*Dothiorella gregaria*	*Alternaria tamaricis*	*Cladosporium cucumerinum*
Dothiorella gregaria	*Leptosphaerulina chartarum*	*Aspergillus flavus*	*Cladosporium macrocarpum*
Penicillium spinulosum	*Peziza ostracoderma*	*Aspergillus sydowii*	*Emericella nidulans*
Penicillium citrinum	*Phoma fungicola*	*Aspergillus tamarii*	*Fungal endophyt*
	Phoma moricola	*Botryotinia fuckeliana*	*Hypocrea lixii*
		Chaetomium globosum	*Penicillium chrysogenum*
		Cladosporium cladosporioides	*Penicillium commune*
		Cladosporium oxysporum	*Penicillium crustosum*
		Cladosporium sp. F42	*Penicillium oxalicum*
		Fungal sp. RTL2	*Penicillium* sp. RF3
		Penicillium chrysogenum	*Phoma medicaginis*
		Penicillium oxalicum	*Torula caligans*
		Talaromyces calidicanius	*Dothiorella gregaria*
			Leptosphaerulina australis

仍为其优势属外，增加青霉属（*Penicillium*）、毛壳属（*Chaetomium*）为优势属。取食前后由雄虫分离培养所得真菌物种仅 6 种相同（图 2），分别为链格孢、茄链格孢 *Alternaria solani*、细极链格孢、黑曲霉、小穴壳属（*Dothiorella*）、瓜枝孢菌 *Cladosporium cladosporioides*。雄虫取食后体内除链格孢属（*Alternaria*）仍为其优势属，增加青霉属（*Penicillium*）、枝孢属（*Cladosporium*）为优势属。

2.5 3 种培养基培养结果和梯度比较

结果表明，比较 3 种不同的培养基，对于丽蝇蛹集金小蜂体内真菌培养效果较好的培养基是查氏培养基（表 2）。PDA 培养基是广谱性培养基，在真菌分离培养实验中应用较多，但在本实验中我们发现 PDA 培养基获得的真菌物种较少。查氏培养基相对与 PDA 培养基而言应用范围相对较少，但本实验中培养真菌物种数目、菌株数量最多。YM 培养基多应用于昆虫体内真菌培养，本实验中培养所得菌种数目与查氏培养基相似，菌株数量低于查氏培养基培养所得结果。

本实验材料设置 6 个稀释梯度，每个梯度设置 2 个重复，经观察可知，浓度为 10^{-1} 和 10^{-6} 培养获得菌种数目较少或无任何菌落生长。10^{-2}～10^{-4} 梯度上长出真菌个数较多，经后续的结果分析得知该梯度范围培养获得真菌物种数目较多。

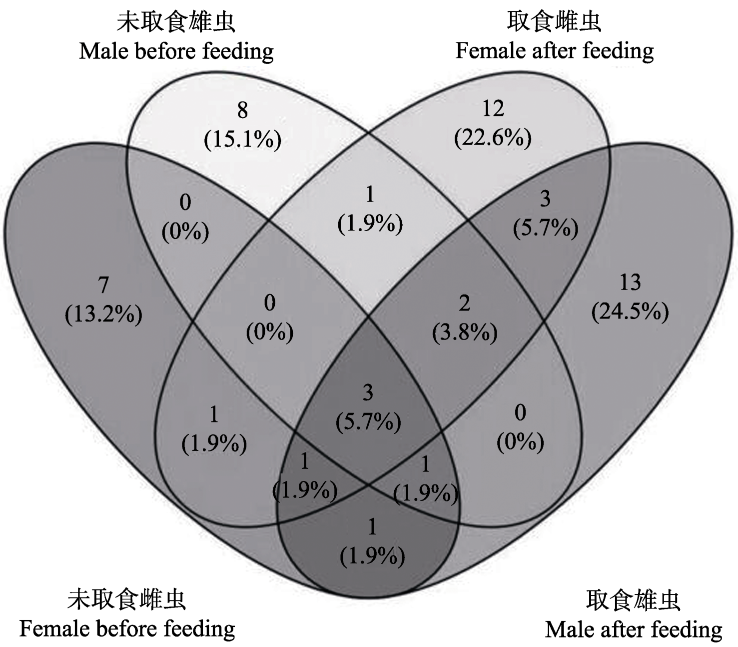

图 1　取食前后丽蝇蛹集金小蜂雌、雄虫体内分可培养真菌数量

Fig. 1　The number of feeding on culturable fungi communities between female and male adults of *Nasonia vitripennis*

表 2　取食后雄虫体内可培养真菌多样性

Table 2　Diversity after feeding on culturable fungi communities in male adults of *Nasonia vitripennis*

PDA 培养基 PDA culture medium	查氏培养基 Czapek culture medium	YM 培养基 YM culture medium
Aspergillus niger	*Aspergillus niger*	*Aspergillus niger*
Aspergillus oryzae	*Alternaria alternata*	*Alternaria alternata*
Cladosporium cucumerinum	*Alternaria ochroleuca*	*Aspergillus flavus*
Cladosporium cladosporioides	*Alternaria solani*	*Aspergillus ochraceus*
	Alternaria tamaricis	*Cladosporium cladosporioides*
	Alternaria tenuis	*Cladosporium macrocarpum*
	Alternaria tenuissima	*Dothiorella gregaria*
	Aspergillus ochraceus	*Emericella nidulans*
	Cladosporium cucumerinum	*Fungal endophyt*
	Hypocrea lixii	*Leptosphaerulina australis*
	Penicillium chrysogenum	*Penicillium oxalicum*
	Penicillium commune	*Penicillium* sp. RF3
	Penicillium crustosum	*Talaromyces funiculosus*
	Phoma medicaginis	*Torula caligans*

3　讨论

本实验将丽蝇蛹集金小蜂雌成虫和雄成虫体内可培养真菌进行分离培养，雄虫体内分离培养菌种数目、菌株数量均多于雌虫，雌雄虫优势菌不同且各具特有菌种。由此推测，丽蝇蛹集金小蜂雌雄虫的性别差异对其体内真菌菌群产生一定影响。这一结果可能与丽蝇蛹集金小蜂的雄性后代具有较短的发育历期，常先于雌蜂发育成熟并羽化有关（Fagerstr and Wiklund，1982；陈中正等，2011；周和锋，2014）。

取食前、后丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内可

培养真菌菌种数目、优势菌种类存在明显差异，成虫取食后经分离培养所得真菌种类、菌种数目均多于取食前。取食前丽蝇蛹集金小蜂雌、雄成虫体内可培养真菌的来源可能为母体遗传、蛹期侵染或外部环境等。昆虫可从母体中获得少量菌体，并在昆虫的不同生长发育期表现出不同程度的增减（谭周进等，2005）。已有报道证明有些真菌对某些昆虫的卵具有侵染作用。Rodrigues 和 Fargues（1980）曾报道过玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosa-roseus* 可侵染两种夜蛾卵。丽蝇蛹集金小蜂成虫期出蜂后接触的外界环境中存在大量真菌，适宜条件下可能对虫体造成侵染。取食后丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内可培养真菌菌种、数量产生波动性。经分析推测，某些菌种或经由食物侵染虫体，如产黄青霉 *Penicillium chrysogenum*、昏暗色串孢 *Torula caligans* 等；或作为补充营养促进丽蝇蛹集金小蜂完成生长发育。目前已有实验针对腐食酪螨与两种寄生真菌常见青霉 *Penicillium frequentans* 和烟曲霉 *Aspergilus funcigatus* 相互关系进行初步研究，结果表明腐食酪螨单独以核桃取食不能完成世代发育，但有真菌存在时能完成（轩静渊等，1993）。本实验中取食前后丽蝇蛹集金小蜂虽同为成虫但处于不同生长发育时期，其体内可培养的某些真菌可能作为补充营养参与完成其生长发育史，有待进一步实验验证探讨。

研究发现，等翅目、同翅目、鞘翅目和膜翅目昆虫普遍与多种真菌存在共生关系。目前已知能够与昆虫共生的真菌包括担子菌（Basidiomycete）、子囊菌（Ascomycetes）、半知菌（Fungi imperfecti）（Paine *et al*.，1997；鲁敏和孙江华，2008；郭军等，2015），而这些真菌主要是昆虫外共生菌，如枝孢属（*Cladosporium*）、青霉属（*Penicillium*）、粘束孢属（*Graphium*）等。由此可推测本实验所得可培养真菌菌种中，优势属枝孢属（*Cladosporium*）、青霉属（*Penicillium*）多生活在成虫体表。国内外针对膜翅目昆虫与真菌互惠共生关系所进行研究的典型昆虫是树蜂（Wood wasps）和白蚁（Termite）（Graham，1967；Whitney，1982；Paine *et al*.，1997；Kobayashi *et al*.，2008）。昆虫通过与真菌形成广泛的共生关系，得以更好地利用资源、适应环境和占领新的生境，从而获得更加有利的生存繁衍机会。

已有研究表明部分青霉属（*Penicillium*）和曲霉属（*Aspergillus*）表现出了对细菌的广谱抑菌活性（徐红星等，2009；周康等，2011）。研究发现，从海绵 *Ircinia felix* 中分离到青霉菌（*Penicillium* sp.），其代谢产物中有多种极性不同的抗菌活性物质（黄奕和李志，2006）。针对及鞭珊瑚 *Chinogorgia rebekka* 所进行的真菌多样性研究中，枝孢属（*Cladosporium*）和青霉属（*Penicillium*）对革兰氏阳性病原细菌表现出较好活性（Wang *et al*.，2011）。据此推测曲霉属（*Aspergillus*）、青霉属（*Penicillium*）、枝孢属（*Cladosporium*）真菌在丽蝇蛹集金小蜂的化学防御中扮演着重要的作用。

在本研究中由丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内分离多种致病真菌，较为典型的有黄曲霉 *Aspergillus flavus*、赭曲霉 *Aspergillus ochraceus*、细交链孢 *Alternaria tenuis* 等。已有研究表明，赭曲霉 *Aspergillus ochraceus* 侵染的家蚕幼虫的血液中提取的物质注入健康家蚕的体腔中能致死家蚕，从而说明有毒素存在（Kodaira，1962），所分泌的赭曲菌素（Aspochracin）具有麻痹触杀作用（冯明光，1998）。黄曲霉 *Aspergillus flavus* 可分泌黄曲霉毒素（AFT），是霉菌毒素中毒性最大的一类霉素（李志刚等，2003；章挺等，2007；Nogueira *et al*.，2010），可导致昆虫绝育，其分泌的虫曲霉毒素（Asperentin），可影响蛹发育（冯明光，1998）。杂色曲霉 *Aspergillus versicolor* 形成的杂烯亚胺不仅对果蝇成虫有击倒作用，而且对某些真菌有拮抗性（梁宗琦，1988）。细交链孢形成的细隔孢氮杂酸是一种具有杀虫和杀草双重功能的生物活性物质（梁宗琦，1996）；链格孢（*Alternaria*）产生某些真菌毒素是重要致癌因素等（甄应中等，1988）。此类致病菌种在丽蝇蛹集金小蜂体内大量存在，并未引起丽蝇蛹集金小蜂不良反应，推测这可能与其自身免疫有关（初源，2013）。目前，溶菌酶（沈同，1990；朱小奇等，2015）、昆虫酚氧化酶（时超美，2000）、

抗菌肽（金光，2008；吴钰婧等，2009）等免疫抗菌因子已从昆虫体内分离并鉴定。其中，已有超过 200 多种昆虫抗菌肽类物质在鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目和蜻蜓目等 8 个目的昆虫中发现。通常来说昆虫抗菌肽抗菌谱较广，然不同抗菌肽因实验菌种不同所表现活性不同。因此，丽蝇蛹集金小蜂体内可能同样含有此类抗菌物质，并因其针对不同菌种活性不同使实验所得菌种间数量产生差异。

本实验在分离丽蝇蛹集金小蜂体内真菌时采用了 3 种培养基，力求最大限度地分离虫体体内可培养真菌。在培养条件上也主要针对好氧、中温菌进行培养，试验中的温度、相对湿度和光照等因子的设定尽可能接近自然状态，研究结果可以为今后进一步研究昆虫体内可培养真菌多样性提供参考。本实验中查氏培养基所获得真菌数目最多，而广谱性培养基 PDA 培养所得菌种数目最少。作为昆虫体内真菌培养应用较多的 YM 培养基（Nguyen *et al.*，2007）。所得菌种数目与查氏培养基所得结果相似，菌株数量低于查氏培养基。

4　结论

通过 3 种培养基对丽蝇蛹集金小蜂雌雄成虫体内真菌进行分离培养，共得到 49 种真菌物种，隶属子囊菌门，盘菌亚门的座囊菌纲、散囊菌纲、锤舌菌纲、子囊菌纲，共 10 个属，其中以链格孢属、枝孢属、青霉属为优势属。

就丽蝇蛹集金小蜂体内可培养真菌物种数目而言，雄虫多于雌虫，取食后多于取食前。由 3 种培养基培养获得的结果表明本次实验中真菌培养效果较好的培养是查氏培养基，最佳浓度梯度范围为 10^{-2}~10^{-4}。

参考文献 (References)

Brucker RM, Bordenstein SR, 2012. The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution*, 66(2): 349–362.

Brucker RM, Bordenstein SR, 2013. The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science*, 341(6146): 667–669.

Chen ZZ, Liu JB, He Z, Duan BS, Hu HY, 2011. Strategies of *Pachycrepoideus vindemmiae* parasitizing pupae of houseflies. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1765–1769. [陈中正, 刘继兵, 贺张, 段毕升, 胡好远, 2011. 蝇蛹金小蜂对家蝇蛹的寄生策略. 应用昆虫学报, 48(6): 1765–1769.]

Chu Y, Zhou F, Zhang MM, An CJ, 2013. Frontiers of research on the innate immune response in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 311–320. [初源, 周帆, 张明明, 安春菊, 2013. 昆虫天然免疫反应研究前沿. 应用昆虫学报, 50(2): 311–320.].

Darling DC, Werrn JH, 1990. Biosystematics of *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae): two new species reared from birds' nests in North America. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(3): 352–370.

Fagerstr MT, Wiklund C, 1982. Why do males emerge before females? Protandry as a mating strategy in male and female butterflies. *Oecologia*, 52(2): 164–166.

Feng MG, 1998. Development of fungal insecticides against sucking mouthparts pests. China Plant Protection Society of Professional Committee of Biological Control, Entomological Society of China. Cross-Strait Symposium on Biological Pest Control Abstracts. Beijing. 8–11. [冯明光, 1998. 开发真菌杀虫剂防治刺吸式口器害虫. 中国植物保护学会生物防治专业委员会, 中华昆虫学会. 海峡两岸害虫生物防治学术研讨会论文摘要, 北京. 8–11.]

Gibson CM, Hunter MS, 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters*, 13(2): 223–234.

Gilliam MP, Dorothy B, 1972. Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20(1): 101–103.

Graham K, 1967. Fungal-insect.mutualism in trees and timber. *Aunu. Rev. Entomol.,* 12: 105–126.

Guo J, Wu J, Deng XY, Lin LB, Liu S, Li JL, 2015. Advances in research on insect gut microbiota and their functions. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1345–1352. [郭军, 吴杰, 邓先余, 林连兵, 刘珊, 李继莲, 2015. 昆虫肠道菌群的功能研究进展. 应用昆虫学报, 52(6): 1345–1352.]

Hawksworth DL, 2011. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12): 1422–1432.

Hawksworth DL, Rossman AY, 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87(9): 888–891.

Hedrick LR, Burke GC, 1950. Yeasts from Hawaiian fruit flies: their

identification and ability to produce riboflavin. *Bacteriology*, 59(4):481–484.

Huang Y, Li ZY, 2006. Chemical defense and active compounds of sponge and sponge-associated microorganisms. *Biotechnology Bulletin,* (1): 14–15. [黄奕, 李志勇, 2006. 海绵及其共附生微生物的活性物质与化学防御. 生物技术通报, (1): 14–15.]

Jin G, 2008. Insect antimicrobial peptides. *Biology Teaching*, 33(3): 60–61. [金光, 2008. 昆虫抗菌肽. 生物学教学, 33(3): 60–61.]

Kobayashi C, Fukasawa Y, Dai Hirose, Kato M, 2008. Contribution of symbiotic mycangial fungi to larval nutrition of a leaf -rolling weevil. *Evol. Ecol.*, 22(6): 711–722.

Kodaira Y, 1962. Studies on the new toxic substances to insects destruxins A and B produced by ospora destructor part (I): Isolation and purification of destruxin A and B. *Agri. Biol. Chem.*, 26(1): 36–42.

Liang ZQ, 1988. Comprehensive Utilization of insect pathogenic fungi//Chinese Insect Fungi Research and Applications (Vol. I). Beijing: Academic Journals Press. 26–35. [梁宗琦, 1988. 昆虫病原真菌的综合利用研究//中国虫生真菌研究与应用(第一卷). 北京: 学术期刊出版社. 26–35.]

Liang ZQ, 1996. Biodiversity of entomogenous fungi. *Chinese Biodiversity*, 4(4): 235–241. [梁宗琦, 1996. 虫生真菌的多样性. 生物多样性, 4(4): 235–241.]

Liu LJ, Li ZH, Dai Y, 2011. Research progress on the bacterial and fungal symbionts in fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Biosafety*, 20(2): 91–99. [柳丽君, 李志红, 戴阳, 2011. 实蝇共生菌研究进展. 生物安全学报, 20(2): 91–99.]

Li ZG, Yang BL, Yao JH, Xu J., 2003. Surface of binding of *Aflatoxin* B_1 by Lactic acid bacteria. *Chinese Joural of Food Hygiene*, 15(3): 212–215. [李志刚, 杨宝兰, 姚景会, 徐进, 2003. 乳酸菌对黄曲霉毒素 B_1 吸附作用的研究. 中国食品卫生杂志, 15(3): 212–215.]

Li ZZ, 1997. Development of insect mycology//China Research and Application of Insect Fungi. (Vol IV). 10-14. [李增智, 1997. 昆虫真菌学的发展//中国虫生真菌的研究与应用. 第四卷.10–14.]

Lu M, Sun JH, 2008. Interactions among scolytid bark beetles and the associated fungi during attacking the living conifers. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 518–526. [鲁敏, 孙江华, 2008. 危害松树的小蠹虫与其伴生菌的相互关系. 昆虫知识, 45(4): 518–526.]

Niu LH, 2013. Research on the microbial diversities associated with the ovaries and four wasp species of *Ficus hispida*. Doctor dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [牛丽华, 2013. 对叶榕榕果和四种榕小蜂的细菌多样性. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Nguyen NH, Suh SO, Blackwell M, 2007. Five novel Candida species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. *Mycologia*, 99(6): 842–858.

Nogueira JH, Gonalez E, Galleti SR, Facanali R, Marques MOM, Felicio JD, 2010. Ageratum conyzoides essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1): 55–60.

Noyes JS, 2002. Interactive catalogue of world Chalcidoidea (Taxapad 2002). Electronic Publication (CD-ROM).

Paine TD, Raffa KF, Harrington TC, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifer. *Aunu.Rev. Entomol.*, 42: 179–206.

Rodrigues R, Fargues J, 1980. Pathogenicity of entomopathogenic *Hyphomycetes paecilomyces* fumosoroseus and *Nomuraea rileyi* to eggs of noctuids, *Mamestra brassicae and Spodoptera littoralis*. *J.Invertebr .Pathol.*, 36(5): 399–408.

Shen T, 1990. Biochemistry. Beijing: Beijing Higher Education Press. 280–281. [沈同, 1990. 生物化学. 北京: 北京高等教育出版社. 280–281.]

Shi CM, 2000. Insect Prophenoloxidase activation and its role in immunity. *Entomological Knowledge*, 37(5): 310–314. [时超美, 2000. 昆虫酚氧化酶原活化及其在免疫中的作用. 昆虫知识, 37(5): 310–314.]

Subandiyah SNN, Sato H, Wagiman F, Tsuyumu S, Fukatsu T, 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41(5): 509–513.

Suh SO, Gibson CM, Blackwell M, 2004. *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1883–1890.

Suh SO, Nguyen NH, Blackwell M, 2008. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.*, 8(1): 88–102.

Sung-Oui Suh JVM, David D, Pollock, Meredith B, 2005. The beetle gut: a *hyperdiverse* source of novel yeasts. *Mycological Research*, 109(3): 261–265.

Tan ZJ, Xiao QM, Xie BY, Yang YH, Feng LX, 2005. A review on endosymbionts in Insects. *J. Microbial. China*, 32(4): 140–143. [谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 杨宇红, 冯兰香, 2005. 昆虫内共生真菌研究概况. 微生物学通报, 32(4): 140–143.]

Wainright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK, 1993. Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science*, 260(5106): 340–342.

Wang YN, Shao CL, Zheng CJ, 2011. Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the gorgonian echinogor from the South China Sea. *Marine Drugs*, 9(8): 1379–1390.

Whitney HS, 1982. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms//Mitton JB, Sturgeon KB (eds.). Bark Beetles in North American Conifers. Texas: Austin Univ. 183–211.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1): 315–322.

Wu YJ, Wang H, Ye GY, 2009. Insect antifungal peptides. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(2): 317–323. [吴钰婧, 王欢, 叶恭银, 2009. 昆虫抗真菌肽. 昆虫知识, 46(2): 317–323.]

Xuan JY, Wang ZS, Wang CB, Yu SD, 1993. Preliminary research of relationship between *tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and two parasitic fungi. *GRAIN Storage,* 22(3): 21–26. [轩静渊, 王忠肃, 王朝斌, 余世东, 1993. 腐食酪螨与两种寄生真菌相互关系的初步研究. 粮食储藏, 22(3): 21–26.]

Xu HX, Zheng XS, Liu SP, Ye GY, Lv ZX, 2009. The role of endosymbionts in insect host resistance against adverse factors. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(3): 350–354. [徐红星, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤, 2009. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识, 46(3): 350–354.]

Zhang JC, Yang DR, Chen JY, Li Y, 2011. Studies on the species diversity and their comparison of endophytic fungi from female and male syconia of tropical *Ficus oligodon*. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 26(3): 298–302. [张建春, 杨大荣, 陈吉岳, 李玉, 2011. 热带苹果榕雌雄隐头果内生真菌物种多样性及其对比研究. 云南农业大学学报, 26(3): 298–302.]

Zhang T, Hu LB, Wang F, Cheng LG, Shi ZQ, 2007. Identification of B-FS06 and the antagonistic activity of its cultural productions against *Aspergillus flavus*. *Chinese Journal Biological Control*, 23(2): 160–165. [章挺, 胡梁斌, 王飞, 程罗根, 石志琦, 2007. 拮抗菌 BFS06 的鉴定及其发酵产物对黄曲霉的抑制作用. 中国生物防治, 23(2): 160–165.]

Zhen YZ, Han SY, Wang XL, Xu M, Ding LP, 1988. Research on the toxicity and Alternaria toxin production conditions. *Mycosystema*, 7(4): 245–251. [甄应中, 韩绍印, 王秀林, 徐氓, 丁兰萍, 1988. 关于链格孢的毒性及其产毒条件的研究. 真菌学报, 7(4): 245–251.]

Zhou HF, Zheng JT, Zhang TX, Xu YJ, Chen ZM, Duan BS, Hu HY, 2014. Comparative studies on parasitism of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) reared on housefly and fruit fly pupae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 194–199. [周和锋, 郑金土, 张同心, 徐永江, 陈忠梅, 段毕升, 胡好远, 2014. 家蝇蛹和果蝇蛹繁育的蝇蛹金小蜂对果蝇蛹的寄生比较. 应用昆虫学报, 51(1): 194–199.]

Zhou K, Zhang X, Zhang FL, Li ZY, 2011. Community diversity and antimicrobial activity of fungi associated with the South China sea sponges. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 8(30): 7–10. [周康, 张霞, 张风丽, 李志勇, 2011. 中国南海海绵共附生真菌种群多样性及抑菌活性. 中国海洋药物杂志, 8(30): 7–10.]

Zhu XQ, Xie CY, Nie HM, Zhao X, Chen XN, He XH, Song H, Wang JG, Shen H, 2015. The biological properties of an antimicrobial peptide extracted from *Tenebrio molitor*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(3): 712–720. [朱小奇, 谢彩云, 聂荷敏, 赵肖, 陈小娜, 何晓辉, 宋欢, 王俊刚, 申红, 2015. 黄粉虫抗菌肽的提取及其生化特性的研究. 应用昆虫学报, 52(3): 712–720.]

Zhu YM, Li J, Xiong Q, Xie YP, Xue JL, 2011. Isolation and morphological identification of three strains of entomopathogenic fungi of *Carposina sasakii*. *Journal of Shanxi University*, 34(1): 131–136. [朱永敏, 李捷, 熊琦, 谢映平, 薛皎亮, 2011. 三株桃小食心虫病原真菌的分离及形态鉴定. 山西大学学报(自然科学版), 34(1): 131–136.]