

# 益生真菌在橘小实蝇规模化扩繁中的应用潜力\*

马琼可\*\* 郭琼钰\*\* 姚志超 蔡朝辉 李晓雪 顾 健

王珊珊 郑薇薇 张宏宇\*\*\*

(华中农业大学植物科学技术学院, 城市与园艺昆虫学研究所, 武汉 430070)

**摘 要** 【目的】葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 是存在于橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 肠道的共生有益真菌, 本研究通过改变饲料中酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 菌液的配比, 筛选获得最优的橘小实蝇幼虫的饲料配方, 为橘小实蝇规模化扩繁提供理论基础。【方法】利用响应面法 (Response surface methodology, RSM) 设计人工饲料中酵母浸粉、麦麸与 *H. uvarum* 的配比, 统计取食不同配比的饲料后橘小实蝇幼虫的发育历期、蛹重和成虫羽化率, 并计算每种饲料配方的成本; 根据实验结果进行配方优化, 预测取食最优配方饲料幼虫的发育历期、蛹重、成虫羽化率以及成本节约的百分比, 同时, 采用预测的最优饲料配方饲喂幼虫, 统计取食最优饲料配方幼虫的发育历期、蛹重以及成虫羽化率, 验证优化模型下的预测值与试验结果的相符性。【结果】饲料中酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 成分之间的拮抗或协同作用显著影响幼虫的发育历期、蛹重和成虫羽化率 ( $P < 0.0001$ )。在饲料中添加 *H. uvarum* 菌液, 可以减少酵母浸粉的添加量, 并降低饲养成本。通过响应面法模型预测, 获得最优的橘小实蝇饲料配方比例: 每份人工饲料 (375 g) 包括酵母浸粉 3.13 g、麦麸 87.45 g、*H. uvarum* 菌液 4.42 g、玉米粉 40 g、蔗糖 40 g 及水 200 mL。与传统饲料费用相比, 每份人工饲料可节省成本 2.35 元, 三组分 (酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 菌液) 的成本节约百分比为 74.35%。采用最优饲料配方饲喂的幼虫发育历期为 8.76 d, 比预测值缩短了 0.8 d, 蛹重为 13.85 mg, 羽化率为 93.76%, 与预测值没有显著性差异。【结论】响应面法设计优化饲料配方具有一定的可靠性, 葡萄汁有孢汉逊酵母 *H. uvarum* 在橘小实蝇的规模化扩繁中具有一定的应用潜力。

**关键词** 橘小实蝇; 葡萄汁有孢汉逊酵母; 响应面法; 人工饲料; 昆虫不育技术

## The potential application of probiotic fungi for the large-scale propagation of *Bactrocera dorsalis*

MA Qiong-Ke\*\* GUO Qiong-Yu\*\* YAO Zhi-Chao CAI Zhao-Hui LI Xiao-Xue

GU Jian WANG Shan-Shan ZHENG Wei-Wei ZHANG Hong-Yu\*\*\*

(Institute of Urban and Horticultural Pests, College of Plant Science and Technology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** 【Objectives】To determine the optimal larval feed formula for *Bactrocera dorsalis* by changing the ratio of yeast, wheat bran and *Hanseniaspora uvarum* (a symbiotic, beneficial fungus that lives in the intestines of *B. dorsalis*) in the diet, and thereby improve the large-scale propagation of *B. dorsalis*. 【Methods】Response Surface Methodology (RSM) was used to design the ratio of yeast : wheat bran : *H. uvarum*, in an artificial diet. The developmental duration of larvae, pupal weight and the adult emergence rate of *B. dorsalis* raised on each diet were then measured and compared, and the cost of each diet calculated. An optimal diet was developed based on the results, and the development duration of larvae, pupal weight, adult emergence rate, and the cost saving potentially achieved by feeding larvae this diet, predicted. Larvae were then fed the optimal diet and their developmental duration, pupal weight and adult emergence rate compared to the predicted values.

\*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1002100); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-26)

\*\*共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 2305928923@qq.com; 1286437763@qq.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: hongyu.zhang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-12-23; 接受日期 Accepted: 2022-02-09

**[Results]** The antagonistic, or synergistic, effects of yeast, wheat bran and *H. uvarum* significantly affected the duration of the larval period, pupal weight and adult emergence rate ( $P < 0.0001$ ). Adding *H. uvarum* to the diet reduced the amount of yeast and thereby the cost. The optimal larval feed formula predicted by the RSM model for a single batch of artificial feed (375 g) included 3.13 g of yeast, 87.45 g of wheat bran, 4.42 g of *H. uvarum* liquid, 40 g of corn meal, 40 g of sucrose and 200 mL of water. The artificial diet is 2.35 yuan cheaper than the conventional diet, and the percentage cost saving for the three main components (yeast, wheat bran and *H. uvarum*) is 74.35%. The development of larvae fed the optimal diet was 8.76 d, 0.8 d shorter than the predicted value, the average pupal weight was 13.85 mg and the adult emergence rate was 93.76%. There was no significant difference between the predicted and actual values obtained using the optimal diet.

**[Conclusion]** RSM is a useful tool for optimizing feed formulae. Incorporating the fungus *H. uvarum* into the artificial diet has the potential to both improve, and reduce the cost of, the large-scale, commercial propagation of *B. dorsalis*.

**Key words** *Bactrocera dorsalis*; *Hanseniaspora uvarum*; response surface methodology; artificial diet; sterile insect technique

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 是世界上最具入侵性的农业害虫之一(张宏宇和李红叶, 2018), 可危害大范围种植的包括柑橘、桃、香蕉、芒果、番石榴以及其他 250 多种水果和蔬菜, 给果蔬产业造成了极大的经济损失(Chen *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2018), 在我国分布范围不断扩大, 危害不断加重, 2011 年包括橘小实蝇在内的 3 种实蝇仅在广东省内造成的经济损失就高达 33.67 亿元以上(马兴莉等, 2013; 屈海学和孙静双, 2013; 尹英超和王勤, 2014)。

目前, 对橘小实蝇的防治主要是以化学药剂防治和引诱剂诱杀(雷慧德等, 2005; 张宏宇和李红叶, 2011)。近年来, 化学药剂的局限性逐渐显现, 对环境友好型防治方法的需求持续增长(Sethi *et al.*, 2014)。昆虫不育技术(Sterile insect technique, SIT)具有物种特异性, 无污染, 可持续性高, 是一种安全有效的防治手段(Borel *et al.*, 2017; Hulme, 2017), 在许多国家, 已成功防控卫生害虫和具有重要经济意义的实蝇害虫, 如螺旋蝇 *Cochliomyia hominivorax* (Scott *et al.*, 2017)、地中海实蝇 *Ceratitidis capitata* (Silva *et al.*, 2013) 和昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni* (Dominiak *et al.*, 2014) 等。

SIT 技术依赖于释放的不育雄性昆虫与野生雄性有效地竞争, 在自然种群中诱导高比例的不育交配, 从而将繁殖率降低到种群维持的水平之下(Dyck *et al.*, 2005)。SIT 的主要缺点是不育雄虫的生态适应力较低, 因此必须生产足够数量和高质量的虫体以保证这项技术成功实施(Dyck

*et al.*, 2005; Cáceres *et al.*, 2019)。昆虫饲料的相关成本、时间、空间和原料的可获得性是改善昆虫饲养条件的工具, 而目前大规模饲养中酵母等成分的添加使生产成本提高。因此, 迫切需要开发具有低成本高效益的饲养方法(Jurkevitch, 2011; Assemila *et al.*, 2012; Pascacio *et al.*, 2017)。

真菌与昆虫存在普遍的联系(Jonsell and Nordlander, 2004), 参与昆虫的营养、代谢、防御、取食和产卵等活动(Aylward *et al.*, 2012; Becher *et al.*, 2012; Witzgall *et al.*, 2012; Vogel and Moran, 2013; Biedermann and Vega, 2020)。昆虫与真菌表现出的复杂的互作关系以及其在昆虫生命周期的重要作用, 为开发新的害虫绿色防控策略提供了机会(Berasategui *et al.*, 2016)。其中有潜力的应用方向是将益生真菌引入 SIT 技术的大规模饲养环节, 本实验室前期研究结果表明橘小实蝇肠道共生真菌葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 能够显著的缩短宿主生长发育时间且提高成虫的各项生理指标, 是可以应用于实蝇 SIT 扩繁技术中的潜在益生菌(Guo *et al.*, 2021)。因此, 在不降低橘小实蝇生长发育等生理生态指标的前提下, 本研究应用响应面法(Response surface methodology, RSM)对橘小实蝇的人工饲料的成本、幼虫的发育历期、蛹重和成虫羽化率建立响应面模型, 筛选获得基于益生真菌 *H. uvarum* 的低成本效益的最优橘小实蝇幼虫饲料配方, 以期将益生真菌引入 SIT 技术的大规模饲养, 为提高 SIT 技术实施效

率提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

供试橘小实蝇种群来自广东出入境检验检疫局技术中心(现广州海关技术中心),在华中农业大学城市与园艺昆虫研究所养虫室进行连代饲养。养虫室相对湿度为  $70\% \pm 5\%$ , 温度为  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 光周期为 12L:12D。

成虫的人工饲料:蔗糖与酵母浸粉按 3:1 比例混匀,常温干燥保存。

### 1.2 供试菌株

供试菌株葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 由本实验室分离保存。试验时,吸取 60  $\mu\text{L}$  菌液到 150 mL PDA 液体培养基中,于 200 r/min,  $25^\circ\text{C}$  摇床(HYG-A,苏州培英实验设备有限公司)中过夜培养;3 200 g,室温离心 5 min(5810R,德国 Eppendorf 公司)收集菌体,用无菌水重悬至  $\text{OD}_{600}=0.1$  待用。

### 1.3 人工饲料

实验用的基于大规模饲养的橘小实蝇标准饲料配方(参考广州威佰昆生物科技有限公司专利号(201710864918.4)):酵母浸粉 15 g、蔗糖 40 g、玉米粉 40 g、麦麸 80 g 及水 200 mL。

酵母浸粉(英国 Oxoid 公司);蔗糖(国药集团化学试剂有限公司);玉米粉和麦麸为市售商品。

### 1.4 响应面法设计混料配比

饲料配方中蔗糖 40 g、玉米粉 40 g 和水 200 mL 是固定成分与标准饲料一致,酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 菌液( $\text{OD}_{600}=0.1$ )是改变的成分。

使用 3 组分混料实验,利用 Design-Expert™11(Nelder and Mead 1965)软件设计人工饲料中酵母浸粉:麦麸:*H. uvarum* 配比。各成分单价固定为:酵母浸粉:200 元/kg,麦麸:2 元/kg,*H. uvarum* 菌液:2.15 元/kg。实验设计

的原则是通过添加不同质量(g)益生菌 *H. uvarum* 菌液降低饲料中酵母浸粉含量以减低饲养成本。

实验设计中,酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 菌液每种成分改变的重量范围如下: $0 \text{ g} \leq \text{酵母浸粉} \leq 15 \text{ g}$ ;  $80 \text{ g} \leq \text{麦麸} \leq 95 \text{ g}$ ;  $0 \text{ g} \leq \text{H. uvarum} \leq 5 \text{ g}$ 。需要改变的成分占标准饲料配方的 25.3%。其他成分固定不变,占标准饲料配方的 74.7%(蔗糖 40 g、玉米粉 40 g 和水 200 mL)。

### 1.5 实验方法

按照不同饲料配比配制饲料,称量 25 g 除益生菌 *H. uvarum* 外的每种人工饲料置于果蝇瓶(57 mm×57 mm×103 mm)中,用 25 kGy 剂量辐照处理灭菌。然后在辐照处理后的果蝇瓶中加入约 25 头橘小实蝇卵粒,最后加入相应的 *H. uvarum* 菌量。7 d 后从果蝇瓶中随机挑取 15 头幼虫转移到塑料容器(直径 7 cm,高 6 cm)中,塑料容器的底部含一层蛭石,顶部的盖子扎孔以便通风,置于相对湿度为  $70\% \pm 5\%$ , 温度为  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; 光周期为 12L:12D 的培养箱(QHX-250BSH-III,上海新苗医疗器械制造有限公司)中,每天检查化蛹情况并记录化蛹时间。化蛹 3 d 后,使用分析天平(BL120S,德国 Sartorius 公司)分别对蛹进行称重。称重后放回塑料容器中,每天适当喷水,待其羽化后,统计每组处理的羽化率。

根据模型预测的最佳饲料配方配制饲料,加入 25 头橘小实蝇卵粒及相应的 *H. uvarum* 菌,统计记录化蛹时间,蛹重以及羽化率(同以上步骤),分析模型预测的可靠性。

### 1.6 数据统计与建模

使用 Design-Expert™11 软件拟合因素(不同配料比)与响应值(幼虫发育历期、蛹重和羽化率)之间的函数关系,自动选取合适的响应面法(Response surface methodology, RSM)模型。通过方差分析(ANOVA type III)进一步评估所选模型,计算每个模型的拟合度。通过检查模型系数和 95%置信区间(95% CI),确定了每种混

合物组分及其相互作用对各种响应变量的影响的相对大小和方向。计算模型的决定系数 ( $R^2$ ) 和信噪比, 信噪比大于 4 认为模型是可信的 (Smith, 2004)。Box-Cox 曲线用于确定幂变换是否可以提高拟合度 (Box and Cox, 1964), 经分析, 本实验没有需要转换的数据。DFFITS 和 DFBETAS 图用于识别影响力过大的数据点 (Belsley *et al.*, 1981)。计算 Cook 距离用于检查潜在异常值, 原则上不大于 1 (张爱武, 2012), 忽略会导致模型严重缺乏拟合的数据点。本实验中响应变量的拟合模型, 将幼虫发育历期的 run 6, 蛹重的 run 4 和 run 5 以及成虫羽化率的 run 6 数据确定为离群值, 因此在分析时将其忽略。所有测试的统计显著性均设置为  $\alpha = 0.05$ 。在优化分析中, 我们的优化标准是最大程度地节省成本且不降低橘小实蝇生长发育等生理生态指标 (在标准饲养混合物预测的 95% 置信区间内) (Newton, 1993)。每个 RSM 模型突出显示了满足优化标准的轮廓图, 将每个响应变量的

轮廓图覆盖组成一个满足所有响应的优化标准的区域, 在这个可操作区域选取最佳的饲料配比。

## 2 结果与分析

利用 Design-Expert™11 (Nelder and Mead 1965) 软件, 以幼虫发育历期、蛹重和成虫羽化率为响应值, 酵母浸粉、麦麸和葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 菌液为自变量设计试验组合, 配制饲料饲养橘小实蝇, 记录橘小实蝇在每种饲料中饲养的幼虫发育历期、蛹重和成虫羽化率, 并且计算每种饲料配方的成本, 实验设计及结果见表 1。

对数据进行建模, 结果表明, 成本节约百分比、幼虫发育历期、蛹重和成虫羽化率 4 个响应变量对应的拟合模型  $P$  值均小于 0.000 1 (表 2), 表明模型极显著成立, 4 个拟合模型的决定系数  $R^2$  均大于 97%, 所有失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ), 表明无失拟现象, 信噪比均大于 4, 说明模型拟合情况良好 (表 2)。

表 1 实验饲料混合物的配方设计及结果

Table 1 Design and results of the formula for the experimental diet mixtures

| 处理<br>Run | 组分 A: 酵母<br>Component A:<br>Yeast | 组分 B: 麦麸<br>Component B:<br>Wheat bran | 组分 C: HU<br>Component C:<br>HU | 成本节约 (%)<br>Cost saving<br>(%) | 发育历期 (d)<br>Duration time<br>(d) | 蛹重 (mg)<br>Pupal weight<br>(mg) | 羽化率 (%)<br>Emergence rate<br>(%) |
|-----------|-----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1         | 3.33                              | 86.67                                  | 5.00                           | 73.08                          | 9.40                             | 14.30                           | 93.00                            |
| 2         | 6.25                              | 86.25                                  | 2.50                           | 54.81                          | 11.06                            | 13.88                           | 55.00                            |
| 3         | 0.00                              | 95.00                                  | 0.00                           | 93.99                          | 17.20                            | 9.20                            | 48.00                            |
| 4         | 6.88                              | 86.88                                  | 1.25                           | 50.90                          | 11.09                            | 15.81                           | 48.00                            |
| 5         | 0.00                              | 91.67                                  | 3.33                           | 93.97                          | 11.69                            | 14.85                           | 48.00                            |
| 6         | 9.38                              | 83.13                                  | 2.50                           | 35.23                          | 11.00                            | 15.78                           | 76.00                            |
| 7         | 7.50                              | 87.50                                  | 0.00                           | 46.99                          | 11.90                            | 12.79                           | 79.00                            |
| 8         | 5.63                              | 85.63                                  | 3.75                           | 58.72                          | 9.80                             | 14.65                           | 84.00                            |
| 9         | 0.00                              | 93.33                                  | 1.67                           | 93.98                          | 11.95                            | 9.74                            | 30.00                            |
| 10        | 15.00                             | 80.00                                  | 0.00                           | 0.00                           | 11.01                            | 14.28                           | 85.00                            |
| 11        | 5.00                              | 90.00                                  | 0.00                           | 62.66                          | 14.20                            | 10.94                           | 76.00                            |
| 12        | 11.67                             | 80.00                                  | 3.33                           | 20.87                          | 11.09                            | 15.83                           | 72.00                            |
| 13        | 10.00                             | 85.00                                  | 0.00                           | 31.33                          | 11.50                            | 15.13                           | 84.00                            |
| 14        | 0.00                              | 92.50                                  | 2.50                           | 93.98                          | 11.80                            | 9.18                            | 38.00                            |
| 15        | 6.67                              | 83.33                                  | 5.00                           | 52.19                          | 11.19                            | 15.43                           | 78.00                            |

| 续表 1 ( Table 1 continued ) |                                   |                                        |                               |                                |                                    |                                   |                                    |
|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 处理<br>Run                  | 组分 A: 酵母<br>Component A:<br>Yeast | 组分 B: 麦麸<br>Component B:<br>Wheat bran | 组分 C:HU<br>Component C:<br>HU | 成本节约 (%)<br>Cost saving<br>(%) | 发育历期 ( d )<br>Duration time<br>(d) | 蛹重 ( mg )<br>Pupal weight<br>(mg) | 羽化率 ( % )<br>Emergence rate<br>(%) |
| 16                         | 3.13                              | 89.38                                  | 2.50                          | 74.39                          | 11.07                              | 13.02                             | 71.00                              |
| 17                         | 13.33                             | 80.00                                  | 1.67                          | 10.44                          | 11.15                              | 14.50                             | 70.00                              |
| 18                         | 0.00                              | 90.00                                  | 5.00                          | 93.96                          | 11.72                              | 9.28                              | 42.00                              |
| 19                         | 12.50                             | 80.00                                  | 2.50                          | 15.65                          | 11.09                              | 15.09                             | 70.00                              |
| 20                         | 10.00                             | 80.00                                  | 5.00                          | 31.31                          | 10.80                              | 15.71                             | 64.00                              |
| 21                         | 5.00                              | 85.00                                  | 5.00                          | 62.63                          | 9.45                               | 14.05                             | 88.00                              |
| 22                         | 10.00                             | 80.00                                  | 5.00                          | 31.31                          | 10.92                              | 15.59                             | 67.00                              |
| 23                         | 1 500                             | 80.00                                  | 0.00                          | 0.00                           | 11.03                              | 14.21                             | 86.00                              |
| 24                         | 6.25                              | 86.25                                  | 2.50                          | 54.81                          | 11.08                              | 14.45                             | 63.00                              |
| 25                         | 5.00                              | 85.00                                  | 5.00                          | 62.63                          | 9.40                               | 14.41                             | 91.00                              |
| 26                         | 7.50                              | 87.50                                  | 0.00                          | 46.99                          | 11.11                              | 13.04                             | 74.00                              |
| 27                         | 0.00                              | 90.00                                  | 5.00                          | 93.96                          | 11.65                              | 9.77                              | 45.00                              |
| 28                         | 0.00                              | 95.00                                  | 0.00                          | 93.99                          | 17.50                              | 9.31                              | 47.00                              |

HU: 葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 菌液。下表同。HU: *Hanseniaspora uvarum*. The same as below.

| 表 2 响应面模型方差分析<br>Table 2 ANOVA for response surface methodology model |                    |                      |                |                |                        |                                          |                                           |                              |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|----------------|----------------|------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| 响应变量 Response<br>variables                                            | 模型类型<br>Model type | 失拟项<br>Lack of fit   | F 值<br>F-value | P 值<br>P-value | 决定系数<br>R <sup>2</sup> | 校正决<br>定系数<br>Adjusted<br>R <sup>2</sup> | 预测决<br>定系数<br>Predicted<br>R <sup>2</sup> | 信噪比<br>Adequate<br>precision |
| 成本节约百分比<br>Cost saving                                                | Linear             | —                    | —              | —              | 1.00                   | 1.00                                     | 1.00                                      | —                            |
| 发育历期 ( d )<br>Duration time (d)                                       | Reduced quartic    | F = 2.40<br>P=0.13   | 92.35          | <0.000 1       | 0.99                   | 0.97                                     | 0.95                                      | 40.48                        |
| 蛹重<br>Pupal weight                                                    | Reduced quartic    | F = 2.51<br>P = 0.12 | 128.31         | <0.000 1       | 0.99                   | 0.98                                     | 0.96                                      | 30.14                        |
| 羽化率<br>Emergence rate                                                 | Reduced quartic    | F = 0.82<br>P = 0.61 | 98.35          | <0.000 1       | 0.99                   | 0.98                                     | 0.97                                      | 33.50                        |

2.1 成本节约百分比的响应面分析图

计算不同饲料混合物的成本,拟合 3 种成分与成本节约百分比的函数关系,生成一个响应面图,顶点坐标表示标准饲料混合物,因此节省的成本为 0,模型最高可节省的成本为 93.99%(表 1)。根据爬坡方向可知,造成饲料成本最高的成分是酵母浸粉。随着麦麸和 *H. uvarum* 含量的增加,饲料成本明显降低(表 3,图 1)。

2.2 幼虫发育历期的响应面分析图

不同配比饲料饲养的橘小实蝇幼虫的发育历期从 9.4-17.5 d 不等,总体平均发育历期为 11.58 d(表 1)。从图 2(B)可以看出,幼虫发育历期的响应面图为曲面图,表明酵母浸粉:麦麸:*H. uvarum* 混合物 3 成分对幼虫发育历期的影响存在相互作用。*H. uvarum* 对幼虫发育历期的影响最大,其次是麦麸和酵母(表 3,图 2)。

表 3 3 种组分与响应变量的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of the three components on the response variable

| 因素<br>Effects             | 系数估计<br>Coefficient<br>estimate | 95%置信下限<br>95% CI low | 95%置信上限<br>95% CI high | 因素<br>Effects             | 系数估计<br>Coefficient<br>estimate | 95%置信下限<br>95% CI low | 95%置信上限<br>95% CI high |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>成本节约 Cost savings</b>  |                                 |                       |                        | AC                        | 4.95                            | - 27.37               | 37.27                  |
| A                         | 0.00                            | —                     | —                      | BC                        | 1.05                            | - 20.50               | 22.60                  |
| B                         | 93.99                           | —                     | —                      | ABC                       | 159.61                          | 90.64                 | 228.57                 |
| C-HU                      | 93.95                           | —                     | —                      | AB(A-B)                   | 17.53                           | 11.13                 | 23.94                  |
| <b>发育历期 Duration time</b> |                                 |                       |                        | AC(A-C)                   | 43.55                           | - 6.83                | 93.92                  |
| A                         | 10.93                           | 10.48                 | 11.38                  | A <sup>2</sup> BC         | - 277.26                        | - 403.30              | - 151.21               |
| B                         | 17.37                           | 16.92                 | 17.82                  | AB(A-B) <sup>2</sup>      | 22.94                           | 4.87                  | 41.00                  |
| C-HU                      | 154.63                          | 74.34                 | 234.92                 | AC(A-C) <sup>2</sup>      | - 48.27                         | - 92.81               | - 3.73                 |
| AB                        | - 10.94                         | - 13.06               | - 8.82                 | <b>羽化率 Emergence rate</b> |                                 |                       |                        |
| AC                        | - 259.62                        | - 404.11              | - 115.14               | A                         | 85.55                           | 81.46                 | 89.65                  |
| BC                        | - 299.20                        | - 471.68              | - 126.71               | B                         | 46.79                           | 42.70                 | 50.88                  |
| AC(A-C)                   | 132.59                          | 59.19                 | 205.99                 | C-HU                      | - 2 432.22                      | - 2 880.56            | - 1 983.87             |
| BC(B-C)                   | 267.39                          | 67.40                 | 467.39                 | AB                        | 40.15                           | 20.98                 | 59.31                  |
| A <sup>2</sup> BC         | 451.28                          | 277.01                | 625.55                 | AC                        | 4 448.61                        | 3 661.55              | 5 235.66               |
| ABC <sup>2</sup>          | 513.70                          | - 26.99               | 1 054.39               | BC                        | 4 489.31                        | 3 704.30              | 5 274.32               |
| AB(A-B) <sup>2</sup>      | 48.18                           | 27.49                 | 68.87                  | AB(A-B)                   | - 35.81                         | - 92.80               | 21.19                  |
| BC(B-C) <sup>2</sup>      | - 191.50                        | - 320.51              | - 62.49                | AC(A-C)                   | - 2 299.57                      | - 2 668.10            | - 1 931.05             |
| <b>蛹重 Pupal weight</b>    |                                 |                       |                        | BC(B-C)                   | - 2 359.25                      | - 2 722.13            | - 1 996.37             |
| A                         | 14.22                           | 13.74                 | 14.69                  | A <sup>2</sup> BC         | - 7 194.37                      | - 8 393.43            | - 5 995.31             |
| B                         | 9.29                            | 8.82                  | 9.76                   | AB <sup>2</sup> C         | - 4 215.29                      | - 5 293.49            | - 3 137.10             |
| C-HU                      | 9.35                            | - 5.14                | 23.84                  | AB(A-B) <sup>2</sup>      | 205.68                          | 16.29                 | 395.08                 |
| AB                        | 3.97                            | 1.79                  | 6.15                   |                           |                                 |                       |                        |

A: 酵母; B: 麦麸; C: HU 菌液。  
A: Yeast; B: Wheat bran; C: *Hanseniaspora uvarum*.

当麦麸含量最高而酵母和 *H. uvarum* 含量较低时幼虫发育所需时间最长。最短发育历期出现的范围在酵母和麦麸含量较低而 *H. uvarum* 含量较高的区域 (图 2)。

2.3 蛹重的响应面分析图

统计不同配比饲料饲养的橘小实蝇蛹重。结果显示蛹重量为 9.20-15.59 mg, 总平均值为 13.22 mg (表 1)。由图 3 (b) 可以看出蛹重的响应面图为曲面图, 表明三组分对蛹重存在相互影响, 酵母浸粉对蛹重的影响最大, 随着

酵母含量的增加, 蛹重整体上呈现先上升后下降的趋势, 其次是 *H. uvarum* (表 3, 图 3)。

2.4 成虫羽化率的响应面分析图

统计不同配比饲料饲养的橘小实蝇成虫羽化率, 结果表明羽化率在 30%-93%之间, 总平均值为 67% (表 1)。从图 4 (b) 可以看出, 羽化率响应面为曲面图, 表明酵母浸粉-麦麸-*H. uvarum* 三组分对成虫羽化率的影响存在一定的交互作用。在模型中, 酵母浸粉组分对成虫羽化率的影响最大, 其次是麦麸 (表 3, 图 4)。在麦

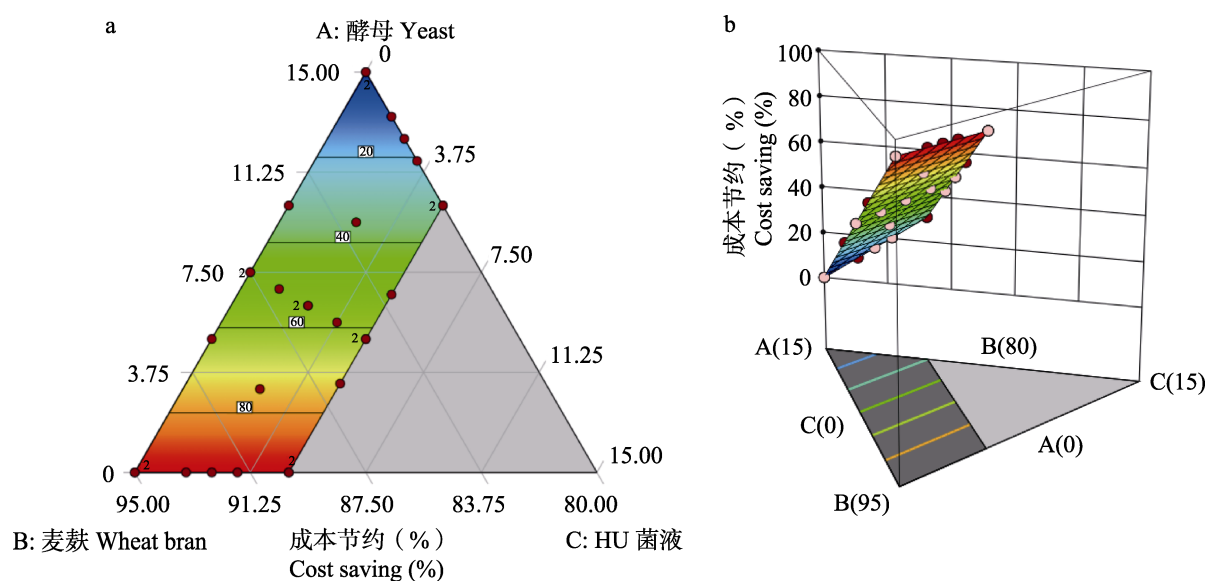


图 1 拟合成本节约的响应面模型

Fig. 1 Response surface models fitted data on cost saving

a. 二维图; b. 三维图。HU: 葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 菌液。下图同。

a. Two-dimensional plot; b. Three-dimensional plot. HU: *Hanseniaspora uvarum*. The same as below.

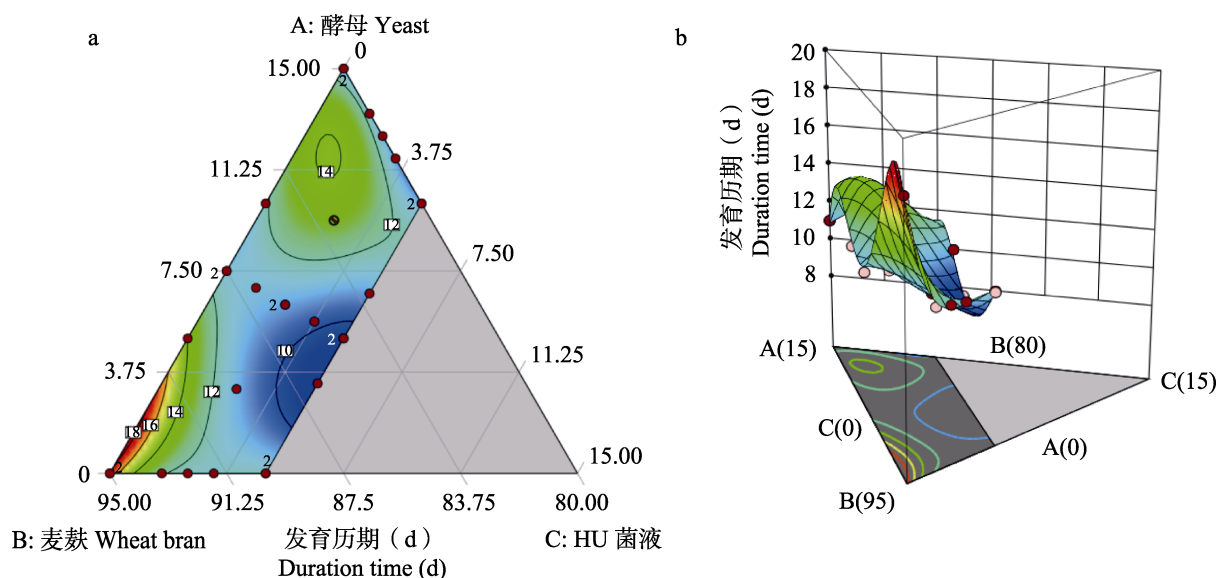


图 2 拟合幼虫发育历期的响应面模型

Fig. 2 Response surface models fitted data on duration of the larval stage

麸和 *H. uvarum* 含量较低, 酵母的含量较高或麦麸与酵母含量较低而 *H. uvarum* 含量较高时拥有最高比例的羽化率, 由此可见在饲料中 *H. uvarum* 的添加可以有效替代酵母浸粉 (图 4)。

## 2.5 配方优化与试验验证

本研究对橘小实蝇饲料配方优化标准是最

大程度地节省成本且不降低橘小实蝇生长发育等生理生态指标。从表 3 可以得出, 蛹重和成虫羽化率最小可接受极限分别为 13.74 mg 和 81.46%, 幼虫的发育时间最大可接受限度为 11.38 d。根据模型预测结果, 图 5 中黄色区域为满足条件的区域, 在此区域内的饲料组合配方均能满足橘小实蝇的生长发育且明显降低成本。在

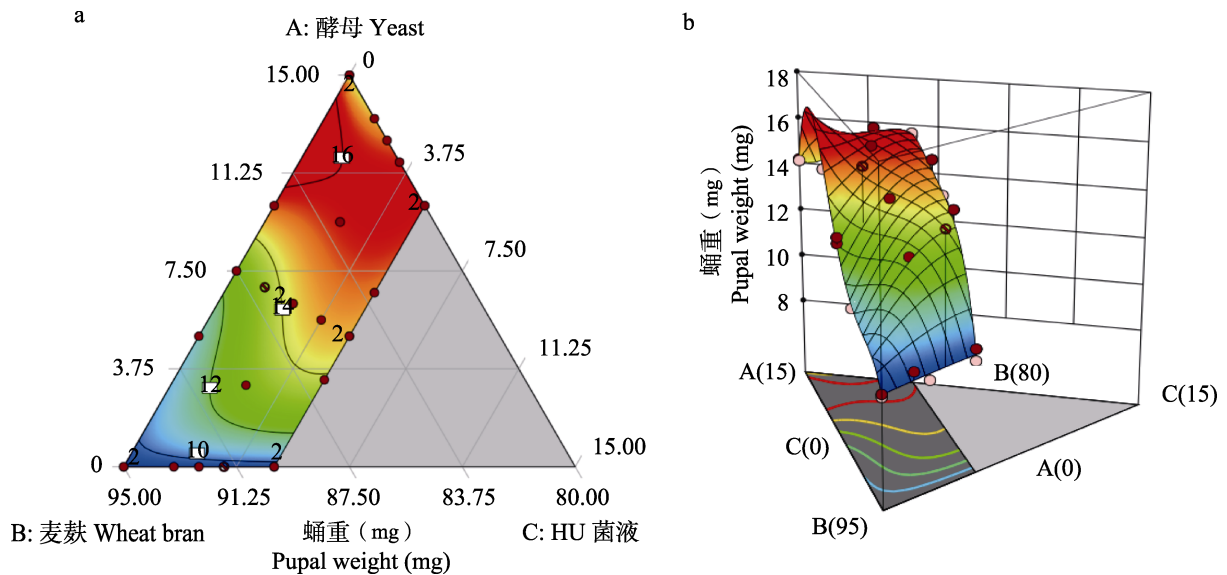


图 3 拟合橘小实蝇蛹重的响应面模型

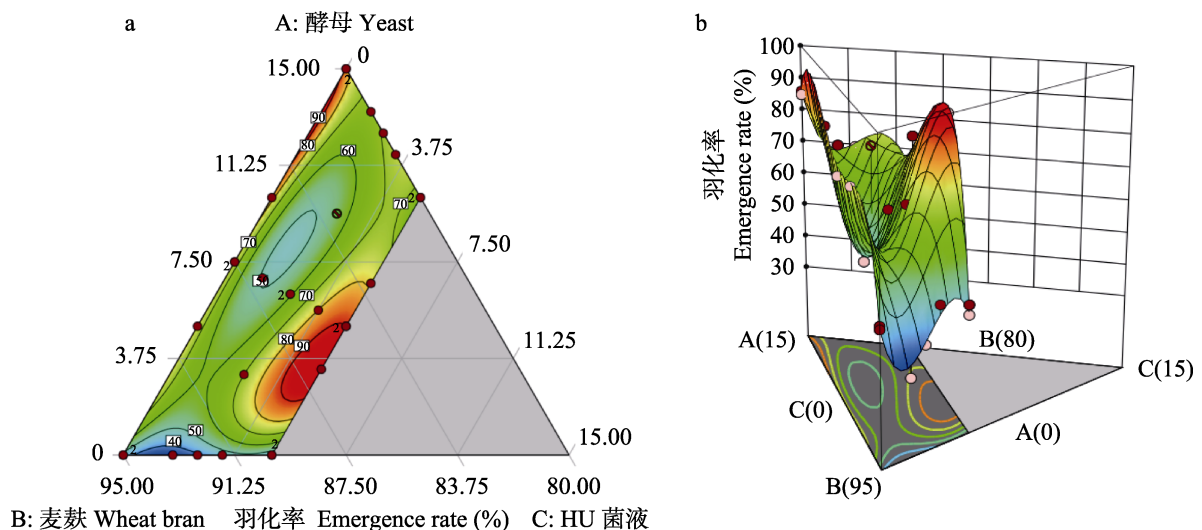
Fig. 3 Response surface models fitted data on pupal weight of *Bactrocera dorsalis*.

图 4 拟合橘小实蝇成虫羽化率的响应面模型

Fig. 4 Response surface models fitted data on adult emergence rate of *Bactrocera dorsalis*

此区域内, 选择其中一个最佳饲料配方: 酵母浸粉 3.13 g、麦麸 87.45 g、*H. uvarum* 4.42 g、玉米粉 40 g、蔗糖 40 g 和水 200 mL。其中酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 组分的成本节约百分比为 73.45%, 每份人工饲料可节省成本 2.35 元。在该条件下预测的幼虫发育历期、蛹重和成虫羽化率分别为 9.56 d、13.74 mg 和 94.57% (图 5), 而从标准饲料中获得的响应变量值分别为

11.02 d、14.25 mg 和 85.5% (表 1)。

对以上最佳饲料配方进行实验验证, 即酵母浸粉 3.13 g、麦麸 87.45 g 和 *H. uvarum* 4.42 g, 其他成分不变, 获得幼虫发育历期为 8.76 d, 蛹重为 13.85 mg, 羽化率为 93.76% (表 4)。蛹重和羽化率与预测值接近, 幼虫发育历期比预测值提前了 0.8 d, 表明响应面优化模型具有一定的可靠性。

表 4 最佳饲料配方的实验验证

Table 4 Experimental validation of optimal feed formulation

| 组分 A:<br>酵母 (g)<br>Component A:<br>Yeast (g) | 组分 B:<br>麦麸 (g)<br>Component B:<br>Wheat bran (g) | 组分 C: HU<br>菌液 (g)<br>Component C:<br>HU (g) | 成本节约 (%)<br>Cost saving<br>(%) | 发育历期 (d)<br>Duration time<br>(d) | 蛹重 (mg)<br>Pupal weight<br>(mg) | 羽化率 (%)<br>Emergence rate<br>(%) |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 3.13                                         | 87.45                                             | 4.42                                         | 73.45                          | 8.76                             | 13.85                           | 93.76                            |

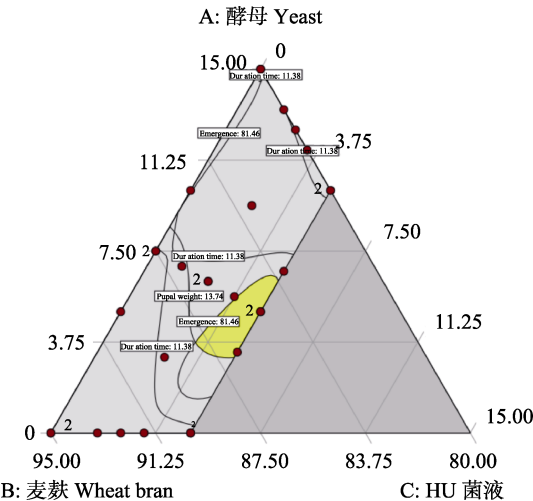


图 5 橘小实蝇人工饲料图形优化

Fig. 5 Graphical optimization of artificial diet for *Bactrocera dorsalis*

图中的黄色阴影区域表示满足优化标准的实验空间，灰色阴影区域是不符合这些标准的空间。

The yellow shaded area in each plot indicates the experimental space meeting optimization criteria, the gray shaded area is the space that does not fit those criteria.

3 结论与讨论

本实验采用混合试验和响应面法研究了橘小实蝇人工饲料中酵母浸粉、麦麸和葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 菌液 3 成分的比例，并得到了一个优化的橘小实蝇配方，能促进幼虫的生长发育，提高成虫羽化率，并能在成本上提供重要的节省。混合试验和响应面法( RSM )作为人工饲料配方优化的策略，能够检验协同作用和拮抗作用，更适合于研究含有多种成分的人工饲料，可以同时多个响应值进行优化和预测 ( Pascacio *et al.*, 2017 )，已应用于象鼻虫 *Diaprepes abbreviatus* 和太平洋白虾等物种的人工饲养中 ( Lapointe *et al.*, 2008; Forster

*et al.*, 2010 )。

本研究表明，酵母浸粉、麦麸和 *H. uvarum* 3 种成分之间存在拮抗或协同作用，显著影响幼虫的发育历期、蛹重和成虫羽化率 ( 表 3 )。3 成分之间相互作用比单一成分对响应变量造成的影响或高或低，因此同时考虑几种成分的组成比单独添加或减少某一种成分更好。这与陈毅超等 ( 2013 ) 对橘小实蝇人工饲料的研究基本一致，他们的研究发现饲料中酵母粉、麦麸和蔗糖的含量显著影响橘小实蝇的化蛹率、幼虫历期、蛹重、雌雄性比、单雌产卵量和卵孵化率，但蔗糖、酵母和麦麸的含量对橘小实蝇各生长指标的作用并不孤立，并存在交互作用。因此，改变饲料中多种成分的比例才能更好地提高饲养效果。

不育昆虫技术 ( SIT ) 是一种环境友好型的害虫防控措施，SIT 的成功实施依赖于压制性数量的不育雄虫释放，不育雄虫的适应性和成本效益是阻碍其实施效率的重要因素 ( Cáceres *et al.*, 2019 )。因此，我们的重点放在饲养高质量不育雄虫和降低运营成本上。

本研究表明，在饲料中添加真菌 *H. uvarum* 菌液可以缩短幼虫的发育历期，提高蛹重和羽化率，*H. uvarum* 菌能够作为潜在益生菌增加橘小实蝇虫体的适应性，从而为防治橘小实蝇提供高质量不育雄虫。与 Guo 等 ( 2021 ) 的研究结果一致，他们发现多种肠道真菌对宿主的生长发育具有显著的促进作用，益生菌 *H. uvarum* 能够显著缩短幼虫发育历期，增加幼虫体长，且这种益生作用能够延续至蛹及成虫阶段，增加蛹重、成虫体重、成虫翅长和成虫飞行能力。此外真菌可以影响昆虫存活率和成虫的繁殖力等许多生理参数 ( Douglas, 2015 )。但我们的实验仅对幼虫发育历期、蛹重和成虫羽化率 3 个指标进行了研

究,作为 SIT 防治的试虫,飞行能力,交配能力以及存活率等都是非常重要的指标,需要进一步研究。

此外,饲养昆虫的低成本饲料是保证 SIT 技术成功实施的关键任务之一,可以通过改变饲料中的成分来降低成本 (Assemila *et al.*, 2012)。本研究表明,通过在饲料中添加 *H. uvarum* 菌液可以替代酵母成分,且较小生物量的菌液就可以替代大部分的酵母浸粉,从而降低饲料成本,这证明了 Deutscher 等 (2019) 通过在饲料中添加益生真菌可能会减少所需的酵母粉的分量的猜想。研究表明,在海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的人工饲料中,用明胶和淀粉代替全部和部分琼脂,每千克饲料的成本分别降低了 5 倍和 2 倍 (Sayed *et al.*, 2021)。

在昆虫饲养过程中的微生物污染会对昆虫的质量和性能产生负面影响。幼虫饮食中有益微生物的存在可以减少抗生素的添加 (Deutscher *et al.*, 2019)。一些酵母菌具有拮抗有害细菌的作用 (Rima *et al.*, 2012)。*H. uvarum* 对一些酵母和病原真菌也具有高度的竞争性和拮抗性 (Liu *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2019)。因此,掺入活酵母可能是减少幼虫饲料中抗生素剂量的一种方法,但这是本实验尚未进行的部分,需要进一步测试。

## 参考文献 (References)

- Assemila H, Rezapana M, Vafaei-Shoushtari R, Mehrvar A, 2012. Modified artificial diet for rearing of tobacco budworm, *Helicoverpa armigera*, using the Taguchi method and Derringer's desirability function. *Journal of Insect Science*, 12(100): 1–18.
- Aylward FO, Burnum KE, Scott JJ, Suen G, Tringe SG, Adams SM, Barry KW, Nicora CD, Piehowski PD, Purvine SO, Starrett GJ, Goodwin LA, Smith RD, Lipton MS, Currie CR, 2012. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *ISME Journal*, 6(9): 1688–1701.
- Becher PG, Flick G, Rozpędowska E, Schmidt A, Hagman A, Lebreton S, Larsson MC, Hansson BS, Piškur J, Witzgall P, Bengtsson M, 2012. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26(4): 822–828.
- Belsley DA, Kuh EQ, Welsch RE, 1981. Regression diagnostics: Identifying influential data and sources of collinearity. *International Journal of Market Research*, 144(3): 862–863.
- Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M, 2016. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 100(4): 1567–1577.
- Biedermann PHW, Vega FE, 2020. Ecology and evolution of insect-fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology*, 65: 431–455.
- Borel B, 2017. CRISPR, microbes and more are joining the war against crop killers. *Nature*, 543(7645): 302–304.
- Box G, Cox DR, 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2): 211–243.
- Cáceres C, Tsiamis G, Yuval B, Jurkevitch E, Bourtzis K, 2019. Joint FAO/IAEA coordinated research project on “use of symbiotic bacteria to reduce mass-rearing costs and increase mating success in selected fruit pests in support of SIT application”. *BMC Microbiology*, 19(1): 284.
- Chen SL, Dai SM, Lu KH, Chang C, 2008. Female-specific doublesex dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2): 55–165.
- Chen YC, Chen L, Shang HW, 2013. Application of a mixture design to optimize the artificial diet for the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(3): 354–361. [陈毅超, 陈玲, 商哈武, 2013. 混料设计在优化橘小实蝇人工饲料中的应用. *中国生物防治学报*, 29(3): 354–361.]
- Cheng L, Nie X, Jiang C, Li S, 2019. The combined use of the antagonistic yeast *Hanseniaspora uvarum* with  $\beta$ -aminobutyric acid for the management of postharvest diseases of kiwifruit. *Biological Control*, 137(C): 104019.
- Deutscher AT, Chapman TA, Shuttleworth LA, Riegler M, Reynolds OL, 2019. Tephritid-microbial interactions to enhance fruit fly performance in sterile insect technique programs. *BMC Microbiology*, 19(1): 287.
- Dominiak BC, Sundaralingam S, Jiang L, Fanson BG, Collins SR, Banos C, Daveis JB, Taylor PW, 2014. Evaluating irradiation dose for sterility induction and quality control of mass-produced fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 107(3): 1172–1178.
- Douglas AE, 2015. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60: 17–34.
- Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, 2005. Sterile insect technique. *Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, 3(2): 209–232.
- Forster IP, Dominy WG, Lawrence AL, Castille FL, Patnaik S, 2010. Optimization of a research diet for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using mixture model methodology.

- Aquaculture*, 298(3/4): 260–266.
- Guo Q, Yao Z, Cai Z, Bai S, Zhang H, 2021. Gut fungal community and its probiotic effect on *Bactrocera dorsalis*. *Insect Science*, 29(1): 1744–17917.
- Hulme PE, 2017. Climate change and biological invasions: Evidence, expectations, and response options. *Biological Reviews*, 92(3): 1297–1313.
- Jonsell M, Nordlander G, 2004. Host selection patterns in insects breeding in bracket fungi. *Ecological Entomology*, 29(6): 697–705.
- Jurkevitch E, 2011. Riding the Trojan horse: Combating pest insects with their own symbionts. *Microbial Biotechnology*, 4(5): 620–627.
- Lapointe SL, Evens TJ, Niedz RP, 2008. Insect diets as mixtures: Optimization for a polyphagous weevil. *Journal of Insect Physiology*, 54(7): 1157–1167.
- Lei HD, Hu JH, Li HY, Liu HQ, Yao TS, 2005. Advances on the study of dangerous citrus pests. The 9th Member Congress and 2005 Academic Annual Meeting of China Plant Protection Society. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. 522–527. [雷慧德, 胡军华, 李鸿筠, 刘浩强, 姚廷山, 2005. 柑橘危险性害虫研究进展. 中国植物保护学会第九届会员代表大会暨 2005 年学术年会. 北京: 中国农业科学技术出版社. 522–527.]
- Liu HM, Guo JH, Cheng YJ, Luo L, Liu P, Wang BQ, Deng BX, Long CA, 2010. Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters. *Annals of Microbiology*, 60(1): 31–35.
- Ma XL, L ZH, Hu XN, Wu JJ, 2013. The assessment of the economic losses caused by *Bactrocera dorsalis*, *B. cucurbitae* and *B. tau* to Guangdong province. *Plant Quarantine*, 27(3): 50–56. [马兴莉, 李志红, 胡学难, 吴佳教, 2013. 橘小实蝇、瓜实蝇和南亚果实蝇对广东省造成的经济损失评估. 植物检疫, 27(3): 50–56.]
- Newton D, 1993. Statistical intervals—a guide for practitioners. *Quality and Reliability Engineering International*, 9(6): 533–533.
- Pascacio VC, Birke A, Williams T, Aluja M, 2017. Modeling the cost-effectiveness of insect rearing on artificial diets: A test with a tephritid fly used in the sterile insect technique. *PLoS ONE*, 12(3): e0173205.
- Qin YJ, Krosch MN, Schutze MK, Yue Z, Wang XX, Shekhar PC, Agus S, Hee A, Sunday E, Kemo B, 2018. Population structure of a global agricultural invasive pest, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Evolutionary Applications*, 11(10): 1990–2003.
- Qu HX, Sun JS, 2013. Observation on the living habits of *Bactrocera dorsalis* in Beijing. *Chinese Horticultural Abstracts*, 29(2): 51, 62. [屈海学, 孙静双, 2013. 北京地区橘小实蝇的生活习性观察. 中国园艺文摘, 29(2): 51, 62.]
- Rima H, Steve L, Ismail F, 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3: 421.
- Sayed WA, El HA, Jamal ZA, El BH, 2021. Effect of a low cost diet on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrosis virus pathogenicity and sterile insect technique. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1): 117.
- Scott MJ, Concha C, Welch JB, Phillips PL, Skoda SR, 2017. Review of research advances in the screwworm eradication program over the past 25 years. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 164(3): 226–236.
- Sethi A, Delatte J, Foil L, Husseneder C, 2014. Protozoacidal Trojan-Horse: Use of a ligand-lytic peptide for selective destruction of symbiotic protozoa within termite guts. *PLoS ONE*, 9(9): e106199.
- Silva N, Dantas L, Calisto R, Faria MJ, Pereira R, 2013. Improving an adult holding system for Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to enhance sterile male performance. *Journal of Applied Entomology*, 137(s1): 230–237.
- Smith WF, 2004. Experimental Design for Formulation. New York: SIAM Press. 179–182.
- Vogel KJ, Moran NA, 2013. Functional and evolutionary analysis of the genome of an obligate fungal symbiont. *Genome Biology and Evolution*, 5(5): 891–904.
- Witzgall P, Proffitt M, Rozpedowska E, Becher PG, Andreadis S, Coracini M, Lindblom TU, Ream LJ, Hagman A, Bengtsson M, Kurtzman CP, Piskur J, Knight A, 2012. “This is not an apple”—yeast mutualism in codling moth. *Chemistry and Ecology*, 38(8): 949–957.
- Wolbaki, 2020. An artificial feed for citrus fruit fly and its preparation method. China, CN107361255B, 2020-11-06. [广州威佰昆生物科技有限公司, 2020. 一种桔小实蝇的人工饲料及其制备方法. 中国, CN107361255B, 2020-11-06.]
- Yin YC, Wang QY, 2014. Beware of a new pest in northern orchards —*Bactrocera dorsalis*. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2014(11): 48–49. [尹英超, 王勤英, 2014. 警惕北方果园新害虫—桔小实蝇. 河北农业, 2014(11): 48–49.]
- Zhang AW, 2012. Statistical diagnostics of fuzzy linear regression modal based on fuzzy cook distance. *Chinese Journal of Engineering Mathematics*, 29(4): 540–550. [张爱武, 2012. 模糊数据中异常点的一种识别方法. 工程数学学报, 29(4): 540–550.]
- Zhang HY, Li HY, 2011. Key Technologies of Citrus Pest Control. Beijing: China Agricultural Press. 77–79. [张宏宇, 李红叶, 2011. 图说柑橘病虫害防治关键技术. 北京: 中国农业出版社. 77–79.]
- Zhang HY, Li HY, 2018. Color Map of Green Prevention and Control of Citrus Diseases and Pests. Beijing: China Agricultural Press. 116–118. [张宏宇, 李红叶, 2018. 柑橘病虫害绿色防控彩色图谱. 北京: 中国农业出版社. 116–118.]