

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.03.005

# 甲维盐对斜纹夜蛾幼虫肠道细菌的影响

张靳宜<sup>1</sup>, 吕宝乾<sup>2\*</sup>, 杨帆<sup>1</sup>, 何杏<sup>2</sup>, 卢辉<sup>2</sup>, 唐继洪<sup>2</sup>, 梁文豪<sup>2</sup>

<sup>1</sup>海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737;

<sup>2</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737

**摘要:**【目的】斜纹夜蛾幼虫属杂食性、高食量的害虫,通过分子生物学手段对经甲维盐处理后的斜纹夜蛾幼虫肠道微生物进行比对,研究肠道共生菌群受毒剂刺激后的代谢变化,探讨菌株的自身代谢与甲维盐的作用受体的相关性。【方法】基于 Illumina MiSeq 技术测序平台,对取食甲维盐和未取食甲维盐的斜纹夜蛾幼虫中肠细菌的 16S rRNA 可变区进行高通量测序,分析对比细菌群落结构多样性。【结果】肠杆菌属、根瘤菌属在斜纹夜蛾的肠道中占优势地位,经过甲维盐处理后两者的丰度大幅下降。沙雷氏菌属和黄单胞杆菌属在处理中减少到几乎为零,相反,原先不占据优势的棒状杆菌属和甲醇杆菌属,处理后丰度明显上升。【结论】甲维盐处理后的优势菌群以及丰富度均发生变化,表明斜纹夜蛾的肠道菌群结构可能与甲维盐毒理机制有关。

**关键词:** 肠道共生菌; 斜纹夜蛾; 甲维盐; 16S rRNA

## Effect of methylethionin on the intestinal microflora in larvae of *Spodoptera litura*

ZHANG Jinyi<sup>1</sup>, LÜ Baoqian<sup>2\*</sup>, YANG Fan<sup>1</sup>, HE Xing<sup>2</sup>, LU Hui<sup>2</sup>, TANG Jihong<sup>2</sup>, LIANG Wenhao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; <sup>2</sup>Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

**Abstract:** 【Aim】*Spodoptera litura* larvae are polyphagous and voracious pest. The intestinal microorganisms treated with methylretinoin salt were compared to characterise the metabolic changes of intestinal symbiotic microflora exposed to toxicants and the correlation between the metabolism of the strain and the receptor of methyl salt. 【Method】The midgut of *S. litura* larvae collected from the experimental field of Danzhou Agricultural Science Base in Hainan Province was dissected in the laboratory with or without emamectin benzoate immersion. The 16S rRNA variable region of bacteria in the midgut of *S. litura* larvae fed on methyl salt vs. non-methyl salt was sequenced on Illumina MiSeq sequencing platform with high throughput to analyze the diversity of bacterial community structure. 【Result】*Enterobacter* and *Rhizobium* were dominant but their abundance decreased significantly after treatment with methyl salt. In addition, significant changes were observed in *Serratia* and *Xanthomonas*, with a decline almost to zero after treatment. The abundance of *Corynebacterium* and *Methylobacterium*, which not previously dominant, increased significantly after treatment. 【Conclusion】The dominant microflora and richness of *S. litura* treated with methyl salt were different after treatment, suggesting that the structure of intestinal microflora in *S. litura* larvae might be related to the toxicity mechanism of emamectin benzoate.

**Key words:** intestinal symbiotic bacteria; *Spodoptera litura*; methylretinoin; 16S rRNA

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (F.) 属鳞翅目夜蛾科,是一种世界性的农业害虫,是我国主要的农作物害虫,在我国大部分省市均有分布,具有生殖能力大、寄主范围广且食量大的特点,常间歇性大暴

发。据报道,斜纹夜蛾的寄主已达 109 科植物(秦厚国等,2006)。目前,对斜纹夜蛾的防治仍以药剂防治为主。但是,化学药剂的使用导致抗药性的增强,同时对人畜安全及环境造成严重危害。近年

收稿日期(Received): 2018-12-02 接受日期(Accepted): 2019-03-15

基金项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2017026); 中国热带农业科学院基本业务费(1630042017011、1630042018012); 国家科技支撑计划子课题(2015BAD08B03)

作者简介: 张靳宜,女。研究方向: 入侵植物学。E-mail: 1257146781@qq.com

\* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: lvbaoqian@hotmail.com

来,研究者从斜纹夜蛾病原微生物的角度来研究防治斜纹夜蛾的方法,发现斜纹夜蛾体内的病毒、细菌、真菌等病原微生物是调节斜纹夜蛾种群数量的重要因子(罗凯等,2015)。

昆虫的肠道中有大量微生物,由于寄主肠道对寄生的微生物特异蛋白长期进行作用选择,所以菌群与肠道一起协同发育、相互影响。因此,即使同一动物的不同发育历期、不同肠道部位,其体内的肠道微生物也会出现种类和数量的差异(Priya *et al.*, 2012)。肠道菌群在抵御外来病原或者毒剂时,能保持原有数量以维持内环境稳定,并且通过刺激产生代谢物质、增加肠道上皮细胞,以促进寄主的免疫系统进一步进化(张振宇等,2017)。斜纹夜蛾肠道微生物组介导杀虫剂的抗药性已逐步开始研究。如 Gadad & Vastrad (2016)用抗生素清除斜纹夜蛾的肠道微生物后,斜纹夜蛾对农药的抗性降低,而具有正常肠道菌的斜纹夜蛾对农药的抗性则相对较高,说明斜纹夜蛾的肠道微生物能够介导宿主对农药的抗性;Thakur *et al.* (2015)利用硫酸链霉素(streptomycin sulphate)饲喂斜纹夜蛾,改变了其肠道微生物的组成,导致其肠道消化酶活力升高,解毒酶活力降低,该抗生素处理加快了幼虫生长,但并不影响存活率。这些研究均表明,斜纹夜蛾的肠道微生物可能对宿主产生重要的作用。

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(以下简称甲维盐)是一种高效、低毒、低残留的十六元大环内酯类杀虫剂。由于其独特的作用方式,且对鳞翅目害虫幼虫表现出较好的毒性,目前已成为我国广泛使用的用来防治蔬菜害虫的新型农药(车矢男等,2018)。本研究通过对经甲维盐处理后的斜纹夜蛾肠道微生物进行比对,研究肠道菌群受毒剂刺激后的代谢变化,探讨菌株的自身代谢与甲维盐的作用受体的相关性,为进一步解释甲维盐对斜纹夜蛾的作用机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

斜纹夜蛾采自海南省儋州市农科基地实验田,用蓖麻叶人工喂养4代以上,生长温度26~28℃,光周期L:D=12h:12h,相对湿度60%~80%。将待羽化的蛹成对放入养虫笼内。成虫羽化后喂以10%的蜂蜜水,放入当地新鲜木瓜叶以供其产卵。试虫均为4龄幼虫。

### 1.2 样品处理

以蒸馏水为对照,将未经处理的蓖麻叶从主茎剪开,在甲维盐溶液中浸20~25s后取出,自然晾干,喂养2d后,挑出未死的幼虫。将上述幼虫以5头一组,在0~4℃的冰箱中进行5~6h饥饿处理。先用预冷的70%的酒精和2%NaClO进行体表消毒,然后迅速用0.15 mol·L<sup>-1</sup>的NaCl溶液漂洗3次,再放在冰块上截取中肠,去除表面杂质及其内含物,加入含pH7的磷酸缓冲液的微量离心管(1.5 mL)内,在保持低温状态下匀浆。实验重复3次,记为J1、J2、J3。食用未经毒剂处理叶片的幼虫也进行相同处理,分别记为C1、C2、C3。样本放入于-20℃液氮罐中保存待研究。

### 1.3 DNA 抽提

根据E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil试剂盒说明书进行各个样本总DNA抽提,在NanoDrop 2000上进行DNA浓度检测,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的DNA质量。

### 1.4 PCR 扩增和测序

采用通用引物(TCCGTAGGTGAACCTGCCG)和(TCCTCCGCTTATTGATATGC)对基因片段进行扩增。反应总体系25 μL(PCR Buffer 2.50 μL, dNTP 0.50 μL, 引物各1.00 μL, Taq DNA polymerase 0.15 μL, 模板DNA 2.00 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.85 μL), 94℃预变性5.0 min, 变性50 s;在45~60℃下退火50 s, 72℃延伸10 min, 27个循环,最后产物于4℃保存。

在BIO-RAD扩增仪上进行PCR扩增,用2%琼脂糖凝胶回收2 μL的PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化,Tris-HCl洗脱,用1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,在凝胶成像仪上观察并拍照。利用QuantiFluor<sup>™</sup>-ST(Promega, USA)进行检测定量。根据Illumina MiSeq平台(Illumina, San Diego, USA)将纯化后的扩增片段构建PE 2\*300的文库。在Miseq PE300平台进行测序。

### 1.5 数据处理

将Illumina MiSeq平台测序上所得的raw reads中大于10 bp的overlap进行拼接,使用Trimmomatic软件质控过滤。过滤后,在保留至少3个样本的前提下,将序列≥5的物种(operational taxonomic unit, OTU)和序列综合≥20的OTU按最小样本序列

数进行抽平处理,将具有高度相似性(97%)的序列归为一个 OTU 后进行分类学分析(表 1)。根据以上分类学信息进行  $\alpha$ -多样性和样品比较分析,以及处理前后的样本组成及差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲维盐对斜纹夜蛾肠道菌群的结果分析

通过 16S rRNA 基因测序以及  $\alpha$ -多样性分析,

得到 userach 平台的聚类划分单元结果(图 1)。在对照组(C组)3个样本和处理组(J组)的3个样本共有 18 个 OTU,随着测序含量的增加,曲线由最开始的急增逐步趋于平缓,表明幼虫肠道的菌群信息绝大多数被测得。随着测序量的增大,检测到的物种不再增加,说明本次测序量充足,可以反映细菌的广度,可完成后续分析。

表 1 斜纹夜蛾肠道提取物测序 OTU 表

Table 1 OTU table of intestinal extracts from *S. litura* larvae

科 Family	属 Genus	OTU	C1	C2	C3	J1	J2	J3	合计 Sum
f_Aurantimonadaceae	g_Aureimonas	7	2	37	24	4	5	11	83
f_Corynebacteriaceae	g_Corynebacterium_1	24	0	0	14	35	68	112	229
f_Corynebacteriaceae	g_Corynebacterium_1	25	1	1	4	63	128	129	326
f_Corynebacteriaceae	g_Corynebacterium_1	27	0	0	0	2	9	5	16
f_norank_c_Cyanobacteria	g_norank_c_Cyanobacteria	9	2	83	16	31	7	0	139
f_Brevibacteriaceae	g_Brevibacterium	12	2	1	2	3	1	6	15
f_Pseudonocardiaceae	g_Saccharomonospora	3	3	0	0	0	0	0	3
f_Methylobacteriaceae	g_Methylobacterium	19	2	1	6	21	6	6	42
f_Enterobacteriaceae	g_unclassified_f_Enterobacteriaceae	5	35	2	0	1	1	0	39
f_Enterobacteriaceae	g_Serratia	2	9	0	0	0	1	1	11
f_Enterobacteriaceae	g_Enterobacter	15	292	110	28	81	82	56	649
f_Rhizobiaceae	g_Rhizobium	17	10	96	215	4	2	9	336
f_Methylobacteriaceae	g_Methylobacterium	20	4	10	28	64	43	33	182
f_Methylobacteriaceae	g_Methylobacterium	21	6	9	1	3	1	0	20
f_Bacteroidaceae	g_Bacteroides	22	0	0	0	0	1	2	3
f_Xanthomonadaceae	g_Xanthomonas	16	3	10	29	0	0	0	42
f_Enterobacteriaceae	g_Serratia	10	3	0	0	0	1	0	4
f_Methylobacteriaceae	g_Methylobacterium	18	4	18	11	66	22	8	129

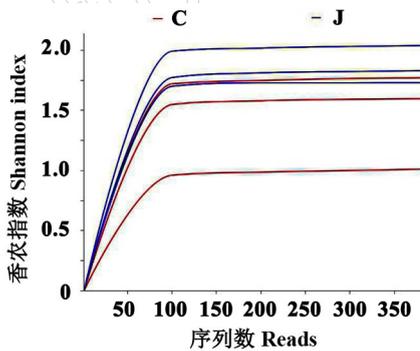


图 1 斜纹夜蛾肠道菌群测序序列香农指数

Fig.1 Shannon index of sequence of intestinal flora of *S. litura*

### 2.2 物种组成分析

2.2.1 从 OTU 的变化看 基于各个样本中的 OTU 数,用 MO-THUR 软件中的韦恩命令对菌群多样性进行分析并做出 Venn 图(图 2A)。仅从细菌的多样性角度对 6 个样本进行定性分析,幼虫肠道菌群在药剂处理后仍然具有相对的保守性。幼虫的肠道样本文库共有的 18 个 OTUs 中,处理过后共同的

OTUs 有 14 个,占两者总值的 77.8%,14 个 OTU 占有不同的比例(图 2B)。说明甲维盐处理后,虫体在未死的状态下,仍然保证了其肠道内容物的完整性。而变化的肠道菌可能是导致甲维盐作用的关键菌群。同时可看出,本地区斜纹夜蛾对于微量阿维菌素类药剂不敏感。

2.2.2 从属的组成角度看 如图 3 所示,从属的角度看,C 组中肠杆菌属 *Enterobacter*、根瘤菌属 *Rhizobium* 占绝对优势,J 组以棒状杆菌属 *Corynebacterium*、甲醇杆菌属 *Methylobacterium* 为优势菌群。C 组中沙雷氏菌属 *Serratia* 和黄单胞杆菌属 *Xanthomonas* 在处理几乎为零。从整体上看,C 组和 J 组共有 10 个不同的属,药剂处理后,细菌的丰富度下降可能与甲维盐直接杀死细菌或间接干扰细菌的正常代谢通路有关。而丰度上升的棒状杆菌属、甲醇杆菌属则有可能与甲维盐的毒理机制关系密切。肠杆菌属在肠道环境变化前后都占有很大的比例,说明该菌对斜纹夜蛾的生理的影响极大。

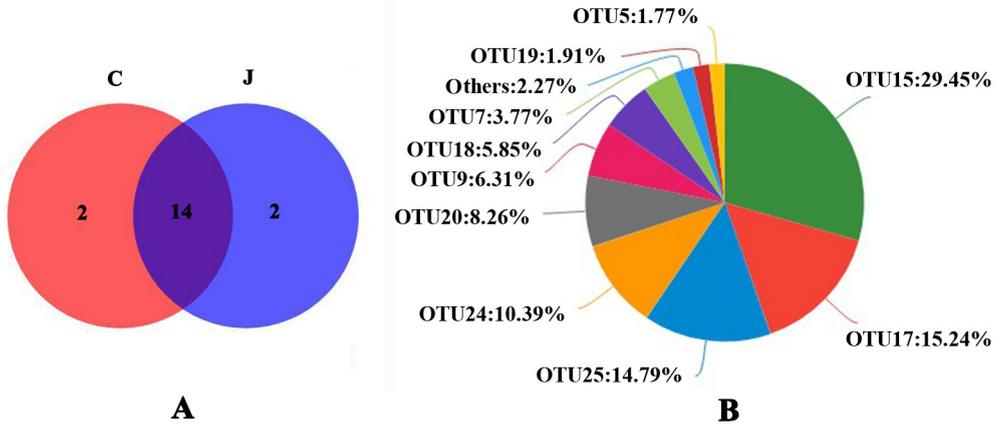


图 2 对照组 (C 组) 和处理组 (J 组) 的差异

Fig.2 Difference between control group (group C) and treatment group (group J)

A: Venn 图; B: 属含量差异图。

A: Venn diagrams; B: Difference of percent of two samples at the genus level.

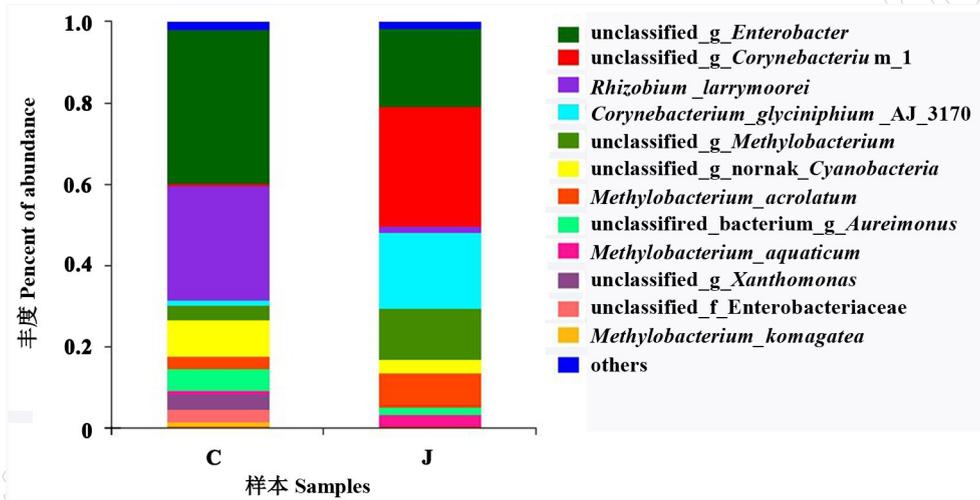


图 3 2 组样本属水平上的细菌丰度图

Fig.3 The abundance of bacteria at the genus level of two samples

### 2.3 2 样本比较与差异分析

2.3.1 组间差异 通过 R 语言统计分析和作图, 基于 PCoA 的图像的的差异离散情况, 分析甲维盐处理前后 2 组的细菌群落组成 (图 4)。结果表明, 对照组 C 和处理组 J 物种组成有差异。

2.3.2 2 组样品细菌种类分析 利用 stamp 软件, 通过 student's 检验 ( $P < 0.05$ ), 对 2 组样品进行属的水平上的差异分析。结果表明, J 组的棒状杆菌属丰度显著高于对照组 ( $** P < 0.01$  和  $* P < 0.05$ ), 说明棒状杆菌的异常增多可能是由于甲维盐在发挥作用 (图 5)。

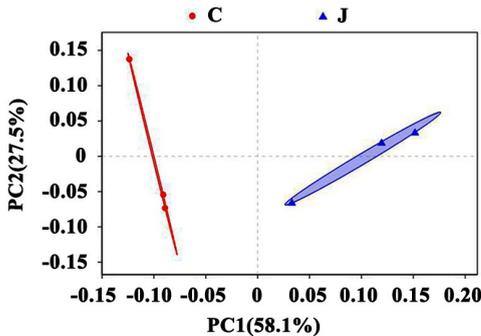


图 4 2 组样本在属的水平上的差异分析

Fig.4 Analysis of differences between two groups of samples at the generic level

### 3 讨论

近年来, 由于高通量测序技术突破了传统生物分离培养中的诸多限制, 如可分离菌量有限、人为操作次数过多导致误差增大等, 使其在研究和判断微生物群落中得到了广泛应用。孙博通等 (2017) 利用传统微生物分离纯培养方法从斜纹夜蛾 4 龄幼虫肠道中共分离鉴定得到 10 株细菌, 其中, 变形菌门和厚壁菌门是斜纹夜蛾肠道可培养细菌中的

优势菌群。功能验证实验表明肠杆菌具备纤维素降解能力,微杆菌具备很强的苯酚降解能力。唐帅等(2016)通过分离蜻蜓和白蚁等昆虫肠道,发现了芽孢杆菌菌株。它可以经发酵可以产生  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA),GABA也是虫体内重要的神经抑制性递质,说明特定昆虫肠道体内的共生菌群可能通过在体内产生酶类物质或者次生代谢物的方式,介导产生神经性递质。本研究表明,甲维盐处理斜纹夜蛾后的杆菌的物种丰度明显提高。这可能是由于

某种杆菌的丰度大幅上升导致杆菌的代谢产物和GABA的含量也随之增加,而GABA恰好为甲维盐的作用受体(毕富春,2003),这一抑制性神经受体的含量增加可以导致害虫逐渐丧失生理活动的积极性,从而产生毒性反应。同时,丰度明显减少的原优势菌群肠杆菌属在肠道环境变化后仍然占据很大的比例,说明该属的组成种类的代谢对夜蛾的生理的影响极大(刘小改,2016)。

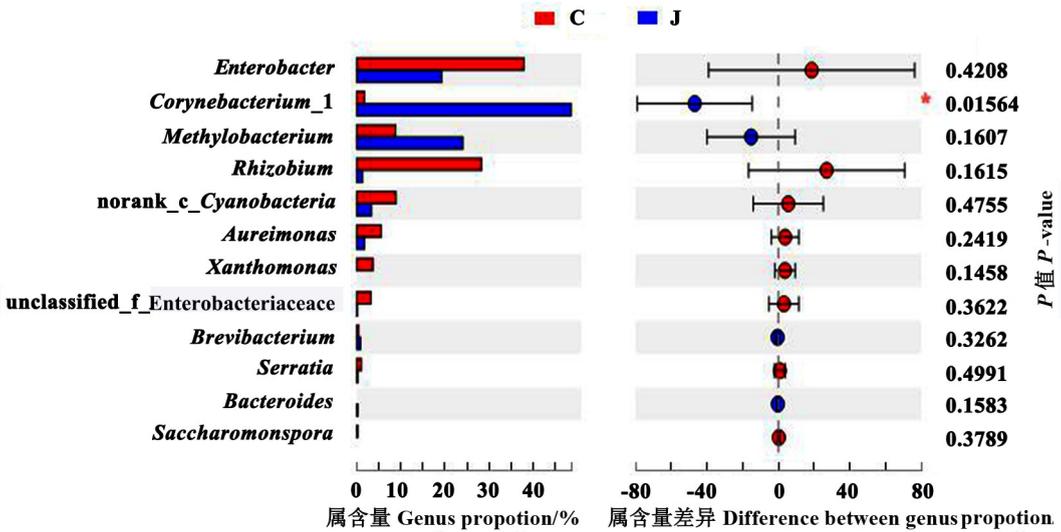


图5 2组样本组间具体属的差异分析

Fig.5 Analysis of the difference of specific genera between the two groups

肠杆菌属是广泛存在于昆虫肠道中的菌体,如在实蝇中,益生菌被开发应用于实蝇的生物防治,完善并提高了SIT的高效和经济性,同时在实蝇代谢生长、抵抗外来病原菌入侵方面都发挥了重要的作用(姚明燕等,2017)。同样大幅下降的根瘤菌属具有代谢产生分解纤维素的能力,所以在植食性昆虫的肠道中广泛存在,如叶峰(张帅帅,2017)、桃蛀螟、松墨天牛和金龟等。经药剂处理后的斜纹夜蛾的生理代谢和食欲下降也极有可能是因为根瘤菌属的下降导致其代谢不了蓖麻叶的纤维和果胶所致。沙雷氏菌属在欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 萜烯化合物的毒性反应中发挥了重要作用,在本实验中其数量几乎减小至无,可能是由于对十六元大环内脂的活力没有解毒作用,也没有适应能力,而被杀虫剂杀死;同时据相关研究,该菌还有分解纤维素的能力(Arku,2017),与处理后斜纹夜蛾食欲下降的实验现象相符,所以该菌可能起到了使夜蛾避食的效力。用Bt杀虫剂处理后,甲醇杆菌

属和棒状杆菌属一起增加(李振等,2016),可能是这类菌更加适合变化后的肠道环境,也有可能参与了虫体内部的自身免疫反应,导致其活性增加。

综上,斜纹夜蛾变化的肠道菌群在经甲维盐处理后,可能通过干扰内部肠道菌群的代谢而产生相应的效力,但该效应是否与甲维盐的作用受体GABA有关、斜纹夜蛾的抗药性的产生和肠道菌群代谢关系还需要进一步的研究。

### 参考文献

毕富春, 赵建平, 2003. 氨基阿维菌素苯甲酸盐对主要害虫药效概述. 现代农药 (2): 34-36, 19.  
 车午男, 李新宇, 李修伟, 张鑫宇, 王睿, 王凯, 纪明山, 2018. 氨基阿维菌素苯甲酸盐的抗性机理研究进展. 农药 (8): 551-554.  
 李振, 韩兰芝, 刘玉娣, 侯茂林, 2016. Bt 杀虫蛋白处理后二化螟幼虫中肠细菌群落的变化. 昆虫学报, 59(3): 292-300.  
 刘小改, 杨亚军, 廖秋菊, 徐红星, 刘映红, 吕仲贤, 2016. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析. 昆虫学报,

- 59(9): 965-976.
- 罗凯, 李泽生, 高燕, 李桂林, 殷山山, 周侯光, 罗仁山, 姚志军, 2015. 斜纹夜蛾生物防治研究进展. *安徽农业科学*, 43(10): 126-129.
- 秦厚国, 汪笃栋, 丁建, 2006. 斜纹夜蛾寄主植物名录. *江西农业学报*, 18(5): 51-58.
- 唐帅, 王艳新, 刘开新, 夏婷婷, 金海如, 2016. 昆虫肠道共生菌中产  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的筛选及鉴定. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 39(3): 320-324.
- 孙博通, 蓝波妙, 王倩, 夏晓峰, 尤民生, 2017. 斜纹夜蛾幼虫肠道细菌分离鉴定及其功能初步分析. *生物资源*, 39(4): 264-271.
- 姚明燕, 季清娥, 陈家骅, 2017. 实蝇肠杆菌科共生菌的研究进展. *生物安全学报*, 26(2): 103-110.
- 姚志超, 白帅, 张宏宇, 2018. 昆虫肠道防御及微生物稳态维持机制. *微生物学报*, 58(6): 1036-1048.
- 张帅帅, 2017. 基于 PCR-DGGE 技术的 3 种植食性叶蜂幼虫肠道细菌群落结构分析. *西北林学院学报*, 32(5): 154-160.
- 张振宇, 圣平, 黄胜威, 赵永顺, 张宏宇, 2017. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用. *生物资源*, 39(4): 231-239.
- ARKU F S, 2017. Mountain pine beetles colonizing historical and naive host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11): 3468-3475.
- GADAD H, VASTRAD A S, 2016. Gut bacteria mediated insecticide resistance in *Spodoptera litura* (FAB.). *Journal of Experimental Zoology India*, 19(2): 1099-1102.
- HOLD G L, PRYDE S E, RUSSELL V J, 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology*, 39(1): 33-39.
- PRIYA N G, OJHA A, KAJLA M K, RAJ A, RAJAGOPAL R, 2012. Host plant-induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 7: e30768.
- THAKUR A, DHAMMI P, SAINI H S, 2015. Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127(3): 38-46.

(责任编辑:郭莹)

<http://www.jbscn.org>