

仁扇舟蛾幼虫肠道可培养细菌群落结构分析

朱 晗, 郝德君*, 魏原芝, 孙丽昕, 文全民

(南京林业大学林学院, 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037)

摘要:【目的】了解仁扇舟蛾(*Clostera restituta*)肠道共生细菌的主要类群及其群落结构特征,明确仁扇舟蛾幼虫前、中和后肠可培养细菌的种类及群落结构组成,为进一步研究特异功能细菌的生理生化特征和功能提供基础。【方法】选取仁扇舟蛾5龄幼虫进行肠道解剖,分离前、中和后肠不同肠段,研磨稀释 $10^{-1} \sim 10^{-6}$,分别涂布于NA和LB固体培养基上,每个处理重复3次,28℃培养72h。后对前、中和后肠可培养细菌进行分离纯化培养,提取细菌基因组DNA,利用16S rDNA基因序列分析和PCR扩增技术,获得细菌基因组序列,后与NCBI GenBank数据库进行Blast同源比对,参考序列相似度98%以上近缘序列的物种信息,结合菌落形态特征和生理生化特性鉴定细菌种类,利用MEGA 7.0软件,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。【结果】从仁扇舟蛾5龄幼虫的前、中和后肠中共分离获得22株可培养细菌,分属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria),共13个属,22个种。其中:假单胞菌属(*Pseudomonas*)4株,罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)3株,芽孢杆菌属(*Bacillus*)3株,嗜麦芽寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)2株,气球菌属(*Aerococcus*)2株,其余微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)和两面神菌属(*Janibacter*)各1株。细菌的种类存在差异,前、中和后肠不同肠段的细菌种类分别为5、10和7种。3个肠段共有的细菌种类是皮氏罗尔斯通菌(*Ralstonia pickettii*)和斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。【结论】仁扇舟蛾5龄幼虫肠道的可培养细菌种类较为丰富,其中以变形菌门和厚壁菌门为优势菌群。不同肠段中可培养细菌的多样性和群落结构存在差异,其中以中肠可培养细菌种类较为丰富。此次从仁扇舟蛾肠道中分离到与单宁降解相关的细菌,分析表明仁扇舟蛾肠道菌群与宿主的取食习性有关,肠道细菌可能在克服植物次生代谢物质的化学防御上发挥作用。

关键词:仁扇舟蛾;肠道细菌;可培养细菌;16S rDNA基因序列;群落结构

中图分类号:S763

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2006(2021)02-0171-06



Community structure analyses of the intestine cultivable bacteria of *Clostera restituta* larvae

ZHU Han, HAO Dejun*, WEI Yuanzhi, SUN Lixin, WEN Quanmin

(Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: 【Objective】This study aimed to analyze the diversity and community structure of culturable bacteria in the foregut, midgut and hindgut of 5th instar larvae of *Clostera restituta*. It also lays a foundation for studying the physiological and biochemical characteristics and functions of specific functional bacteria. 【Method】Sterile dissections of the intestinal tract of the 5th instar larvae, *C. restituta*, were performed to separate the foregut, midgut and hindgut, and homogenized by hand. The gut homogenates were poured on nutrient agar (NA) and lysogeny broth (LB) media in triplicate after serial dilution (10^{-1} to 10^{-6}) and incubated at 28℃ for 72 h. Single colonies were picked and repeatedly streaked on LB medium to obtain pure cultures. The bacterial solutions of each colony were processed for DNA extraction, and bacterial gene sequences were obtained using 16S rDNA gene sequence analysis and PCR amplification technology. The

收稿日期 Received:2019-10-16

修回日期 Accepted:2020-04-29

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(201810298006Z);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJKY19_0879)。

第一作者:朱晗(1034870416@qq.com)。*通信作者:郝德君(djhao@njfu.edu.cn),教授,ORCID(0000-0001-7743-9968)。

引文格式:朱晗,郝德君,魏原芝,等.仁扇舟蛾幼虫肠道可培养细菌群落结构分析[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(2):171-176.ZHU H,HAO D J,WEI Y Z, et al. Community structure analyses of the intestine cultivable bacteria of *Clostera restituta* larvae[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2021, 45(2): 171-176. DOI:10.12302/j.issn.1000-2006.201910011.

sequence match of each 16S rRNA gene sequence was assigned using NCBI BLAST and refers to the species information of adjacent sequences with sequence similarity above 98%. At the same time, morphological observation and physiological and biochemical characteristics of bacterial colonies were also employed for identification of bacterial species. Finally, the phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining (NJ) with MEGA 7.0.【Result】Twenty-two cultivable bacteria were isolated from the intestinal tract of the 5th instar larvae of *C. restituta*, which were grouped into three phyla: Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria, belonging to 13 genera and 22 species. Among them, there were four strains of *Pseudomonas*, three strains of *Ralstonia*, three strains of *Bacillus*, two strains of *Stenotrophomonas*, and two strains of *Aerococcus*; the remaining strains were *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Janibacter*. There were differences in the bacterial species in the different intestinal segments. The species of bacteria in the foregut, midgut and hindgut were 5, 10 and 7, respectively. The common bacteria were *Ralstonia pickettii* and *Pseudomonas stutzeri* in different intestinal segments.【Conclusion】The results indicate that the species of cultivable bacteria in the intestinal tract of the 5th instar larvae of *C. restituta* are relatively rich, mainly colonized by bacteria in the phyla Proteobacteria and Firmicutes, and there are differences in the diversity and community structure of cultivable bacteria among different intestinal segments. Among them, the midgut bacterial species were relatively rich. In this study, the bacteria related to tannin degradation were isolated from the *C. restituta* gut, indicating that the gut bacterial community of *C. restituta* is related to the diet of the host, and the intestinal bacteria may play a role in overcoming the chemical defense of plant secondary metabolites.

Keywords: *Clostera restituta*; intestinal bacteria; cultivable bacteria; 16S rDNA gene sequence; community structure

昆虫在长期协同进化过程中,与病毒、细菌、真菌、原生动物等多种微生物相互选择、相互适应,形成了密切的共生关系。研究表明,昆虫肠道细菌具有多方面的功能,如调节营养代谢帮助宿主分解难以降解的食物变为易于消化吸收的组分^[1];直接为宿主昆虫提供必需氨基酸、维生素等营养物质^[2];分解代谢产生短链脂肪酸(SCFAs)等代谢副产物影响宿主昆虫的脂质和碳水化合物代谢,维持稳态^[3];调控激素的信号途径从而影响宿主昆虫的生长发育及其寿命^[4];降解杀虫剂,保护宿主免受毒害^[5];参与肠道干细胞增殖和上皮细胞再生的生理活动^[6];参与昆虫信息素的合成,调控宿主昆虫种间通讯及种群行为^[7];引起宿主昆虫的物种分化^[8];抑制昆虫寄主植物的防御反应^[9]等等。

仁扇舟蛾(*Clostera restituta*)为鳞翅目(Lepidoptera)舟蛾科(Notodontidae)扇舟蛾属(*Clostera*),具有世代多、产卵量大、幼虫孵化率高、虫口数量易在短期内剧增等特点^[10-11],是杨树重要的食叶害虫。国外分布于印度、越南、马来西亚和印度尼西亚,国内分布于南方的安徽、江苏、上海、浙江、江西、福建、湖南、广东、云南、海南、台湾和香港等地^[10]。近些年,江苏、安徽、上海等地仁扇舟蛾相继爆发成灾,不仅影响了我国重要速生树种——杨树的生长发育,也造成很大程度的生态环境破坏。目前虽然开展了仁扇舟蛾的形态特征^[10]、生物学特性^[11]、与寄主植物的相互关系^[12]以及嗅觉感受蛋白^[13]等方面的研究,但未见其肠道共生微生物的研究报道。本研究采用细菌分离

培养法,利用16S rDNA基因序列分析和PCR扩增技术,结合菌落形态观察和生理生化特征鉴定肠道中可培养细菌的种类,了解仁扇舟蛾肠道共生细菌的主要类群及其群落结构特征,为进一步研究特异功能细菌的生理生化特征和功能奠定基础,也为探讨肠道菌群对宿主的生理功能和生态学意义提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

仁扇舟蛾2~3龄幼虫采自南京市浦口区乌江镇(118°52'E,31°89'N)杨树行道树,带回实验室后置于光暗周期为14L/10D、温度(25±2)℃、相对湿度为(65±5)%的条件下饲养,喂食新鲜的杨树叶片,每日更换1次。以实验室饲养的第2代5龄幼虫为供试昆虫。

1.2 肠道解剖及可培养细菌的分离培养

选取10头健康的5龄幼虫,饥饿处理12h,后用PBS缓冲液冲洗虫体表面多次,置于75%酒精中体表消毒3min,并用无菌水漂洗3次。无菌环境下解剖肠道,将分离的前、中和后肠分别置于2mL离心管中,加入PBS缓冲液0.5mL研磨,并于室温下1000r/min离心3min,取上清液,用无菌水分别稀释 10^{-1} ~ 10^{-6} 倍,涂布于NA和LB固体培养基上。LB固体培养基(1L):蛋白胨10g,酵母浸膏5g,NaCl10g,琼脂15g,pH7.0。NA固体培养基(1L):蛋白胨10g,牛肉膏3g,NaCl5g,琼脂15g,pH7.0。重复3次,置于28℃恒温培养箱

中培养 72 h。根据菌落颜色、大小和形态分离纯化单菌落,纯化所得菌株于 25% 甘油中保存置于 -80 ℃ 备用。

1.3 肠道可培养细菌的形态观察及生理生化实验

利用 LB 固体培养基培养活化所得菌株,待长出单菌落后观察形态特征,包括:大小、形状、颜色、透明度、表面光滑与否及边缘特点等。观察菌体形态,包括菌体单染、革兰染色、芽孢染色和鞭毛染色等。生理生化性状包括酶活测定、H₂S 产生、硝酸盐还原、丙二酸盐及柠檬酸盐的利用、IMViC (吲哚实验、甲基红实验、伏-普实验和柠檬酸盐实验)、碳素化合物利用(糖类和醇类)和大分子化合物水解(淀粉、液化明胶和七叶苷水解)等。

1.4 肠道可培养细菌 DNA 的提取和 16S rDNA 扩增

活化保存备用的菌种,提取细菌基因组 DNA。16S rDNA 通用引物: 27 F (5' - AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1492 R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为 25 μL: ddH₂O 17.25 μL, 10×TransTaq-T Buffer 2.5 μL, gDNA (50 ng/μL) 2.0 μL, Primer 27 F (10 mmol/L) 和 Primer 1492 R (10 mmol/L) 各 0.5 μL, dNTP 2.0 μL, TransTaq-T DNA Polymerase

(5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 30 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃ 保温。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,后送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5 16S rDNA 序列系统发育分析

将测序得到的 16S rDNA 序列用 Clustal X 1.82 软件进行多序列比对,后与 NCBI GenBank 数据库进行 Blast 同源性比对,选取各个菌株的近缘序列,利用 MEGA 7.0 软件,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树,使用 Bootstrap 检验进化树的可靠性,Bootstrap 值为 1 000。

2 结果与分析

2.1 肠道可培养细菌的形态特征

研究分离得到仁扇舟蛾 5 龄幼虫可培养细菌 22 株,其中前肠 5 株,中肠 10 株,后肠 7 株,对其依次编号为 CF1-5、CM1-10 和 CH1-7。纯化后,22 株菌的菌落和菌体形态的观察结果见表 1。其中,3 株菌的形状为球形,19 株为杆状;8 株细菌革兰染色呈阴性,14 株细菌革兰染色呈阳性;9 株细菌有芽孢,8 株细菌有荚膜,18 株细菌有鞭毛。

表 1 仁扇舟蛾幼虫肠道细菌基本特征

Table 1 The basic characteristics of intestinal bacteria in the gut of *Clostera restituta* larval

菌株 strain	细菌形状 bacterium shape	革兰染色 gram staining	芽孢 spore	荚膜 capsule	鞭毛 flagellum	菌落形态 colony morphology
CF1	杆	G ⁻	-	-	+	乳白色,圆形,半透明,凸状,光滑,边缘规则,中小型
CF2	杆	G ⁺	-	-	+	淡黄色,圆形,半透明,不光滑,边缘突起,大型
CF3	球	G ⁺	+	+	-	淡黄色,圆形,透明,不光滑,边缘突起,辐射状,小型
CF4	杆	G ⁻	-	+	+	淡黄色,圆形,透明,凸状,不光滑,辐射状,大型
CF5	球	G ⁺	-	-	-	乳白色,圆形,半透明,边缘规则,小型
CM1	杆	G ⁺	-	+	+	淡黄色,圆形,半透明,凸状,光滑,边缘规则,中小型
CM2	杆	G ⁻	-	-	+	乳白色,圆形,半透明,凸状,光滑,边缘规则,中小型
CM3	杆	G ⁻	-	+	+	乳白色,圆形,半透明,凸状,边缘规则,大型
CM4	球	G ⁺	+	-	-	淡黄色,圆形,透明,边缘突起,不光滑,辐射状,小型
CM5	杆	G ⁺	+	-	+	白色,圆形,不透明,凸状,光滑,边缘规则,小型
CM6	杆	G ⁺	+	-	+	乳白色,圆形,透明,光滑,边缘规则,大型
CM7	杆	G ⁺	+	-	+	乳白色,圆形,不透明,凸状,光滑,大型
CM8	杆	G ⁺	+	-	+	淡黄色,圆形,半透明,凸状,光滑,边缘规则,中型
CM9	杆	G ⁻	-	+	+	淡黄色,圆形,透明,凸状,边缘突起,不光滑,大型
CM10	杆	G ⁻	-	+	+	乳白色,圆形,不透明,凸状,光滑,边缘规则,小型
CH1	杆	G ⁻	-	-	+	乳白色,圆形,半透明,凸状,边缘规则,中型
CH2	杆	G ⁺	+	-	+	粉色,圆形,不透明,凸状,边缘规则,中型
CH3	杆	G ⁻	-	+	+	淡黄色,圆形,透明,凸状,边缘辐射状,边缘规则,中型
CH4	杆	G ⁺	-	-	+	乳白色,圆形,不透明,光滑,中间凹,大型
CH5	杆	G ⁺	-	-	-	白色,圆形,不透明,光滑,小型
CH6	杆	G ⁺	+	-	+	淡黄色,圆形,半透明,凸状,光滑,边缘规则,中型
CH7	杆	G ⁺	+	+	+	淡黄色,圆形,透明,凸状,边缘规则,中小型

注:G⁺.革兰染色阳性 represents gram-positive;G⁻.革兰染色阴性 represents gram-negative;+.有 yes;-无 no。

2.2 肠道可培养细菌的生理生化鉴定及 16S rDNA 基因片段的扩增与克隆

测定结果表明(表 2),所有菌株对糖醇等碳素化合物的利用差异不显著,均具有较强的分解能力。但不同菌株在酶活测定、H₂S 产生、硝酸盐还

原、丙二酸盐及柠檬酸盐利用等方面具有显著差异,少数菌株在 IMViC 实验中呈阳性反应。大多数菌株在大分子化合物水解实验中呈阳性反应,可分解利用淀粉、液化明胶、七叶苷、柠檬酸盐以及丙二酸盐,但不能还原硝酸盐且不能产生 H₂S。

表 2 仁扇舟蛾幼虫肠道可培养细菌各菌株生理生化性状

Table 2 Biochemical characteristics of cultured bacteria in the gut of *Clostera restitura* larval

指标 index	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7	CM8	CM9	CM10	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7	CK
葡萄糖 glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
蔗糖 sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
麦芽糖 maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
乳糖 lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
纤维二糖 cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-木糖 D-xylose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-半乳糖 D-galactose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
海藻糖 trehalose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
棉籽糖 raffinose	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
果糖 fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
甜醇 dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
肌醇 inositol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
甘露醇 mannitol	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
山梨醇 sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
吲哚实验 indol test	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
甲基红实验 methyl red test	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
伏-普实验 voges-prokauer test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
淀粉水解 starch hydrolysis	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
明胶液化 gelatin liquefied	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
七叶苷水解 hydrolysis	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
过氧化氢酶 catalase	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
脲酶 urease	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 phenylalanine dehydrogenase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 two-arginine hydrolase	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
赖氨酸脱羧酶 lysine dehydrogenase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
硝酸盐还原 nitrate reduction	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
H ₂ S 实验 H ₂ S test	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
柠檬酸盐实验 citrate test	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐 sodium malonate	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-

注:“+”表示阳性“+” means positive;“-”表示阴性“-” means negative.

以提取的肠道细菌基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物(27F 和 1492R)扩增后,通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,条带清晰,且获得的细菌 16SrDNA 基因片段全长在 1 500 bp 左右,是实验所需目的片段(图 1)。

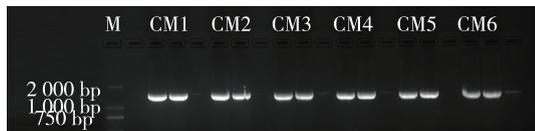


图 1 肠道细菌 DNA PCR 扩增电泳图谱
Fig.1 The electropherogram of the intestinal bacterial DNA PCR amplification

2.3 肠道可培养细菌的系统发育分析

将获得的序列提交 NCBI GenBank 数据库进行 Blast 同源性比对,将测序得到的仁扇舟蛾幼虫肠道细菌 16S rDNA 序列进行系统进化分析,结果见图 2。结合可培养细菌的形态特征和生理生化指标,鉴定结果如下:前肠 5 种细菌分别为皮氏罗尔斯顿菌 (*Ralstonia pickettii*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 和 *Exiguobacterium acetylum*;中肠 10 种细菌分别为极小短小杆菌 (*Curtobacterium pusillum*)、皮氏罗尔斯顿菌、唐菖蒲伯克霍尔德菌 (*Burkholderia ginsengis*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*)、斯氏假单胞菌、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和 *Paenibacillus uliginis*;后肠 7 种细菌分别为皮氏罗尔斯顿菌、钴特省芽孢杆菌 (*Bacillus drentensis*)、斯氏假单胞菌、节杆菌属

(*Arthrobacter*)、短状杆菌属 (*Brachybacterium*)、寡养单胞菌和瓜两面神菌 (*Janibacter melonis*)。

3 讨 论

采用传统培养法结合 16S rDNA 分子鉴定技术,研究了仁扇舟蛾 5 龄幼虫不同肠段的可培养细菌群落结构。结果表明,仁扇舟蛾幼虫肠道内的可培菌种类丰富,其中以变形菌门和厚壁菌门为优势菌群。在同为舟蛾科的栎黄掌舟蛾 (*Phalera assimilis*) 肠道菌的研究中发现其肠道优势菌群也以变形菌门和厚壁菌门为主,以葡萄球菌属和短小杆菌属为主要菌群^[14]。在鳞翅目肠道菌群的相关研究中,大多数可培养细菌都属于变形菌门,其中 α -变形菌门和 γ -变形菌门最为常见;在科水平上,以肠杆菌科、芽孢杆菌科、假单胞菌科、葡萄球菌科、肠球菌科最为常见;在属水平上,假单胞菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、肠杆菌属和肠球菌属最为常见^[15]。在夜蛾科的相关研究中,变形菌门和厚壁菌门为优势菌群,其中克雷伯氏菌属和沙雷氏菌属为优势菌属^[16]。在舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 的肠道中发现分离出的 70% 的细菌属于革兰阳性的 γ -变形菌门^[17]。

昆虫中肠段作为食物消化和吸收的主要场所,菌群种类和数量相对较高。本研究发现肠道细菌的种类会随着肠段的不同有所差异,如中肠段特有极小短小杆菌、唐菖蒲伯克霍尔德菌、蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和 *Paenibacillus uliginis*。此外,相邻肠段之间往往存在相同的细菌,例如从前肠和中肠中分离出的气球菌属,中肠和后肠共有的寡养单胞菌。前、中和后肠等 3 个肠段共有的细菌为皮氏罗尔斯顿菌和斯氏假单胞菌。

昆虫肠道菌群不仅与宿主有关,而且与环境、取食的寄主植物有极大的关系。杨树叶片中含有较为丰富的单宁^[18],仁扇舟蛾作为杨树重要的食叶害虫,相关研究表明节杆菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属均可降解单宁^[19]。本研究分离到仁扇舟蛾肠道中的这些细菌可能在克服植物次生代谢物质的化学防御上发挥重要作用。

综上所述,本研究首次分析了仁扇舟蛾幼虫肠道可培养细菌的种类与群落结构组成。这些细菌可能在提高宿主昆虫对环境的适应性、为宿主提供营养和降解外源有毒物质等方面发挥作用,相关功能有待后续研究。

参考文献 (reference):

[1] ENGEL P, MORAN N A. The gut microbiota of insects-diversity

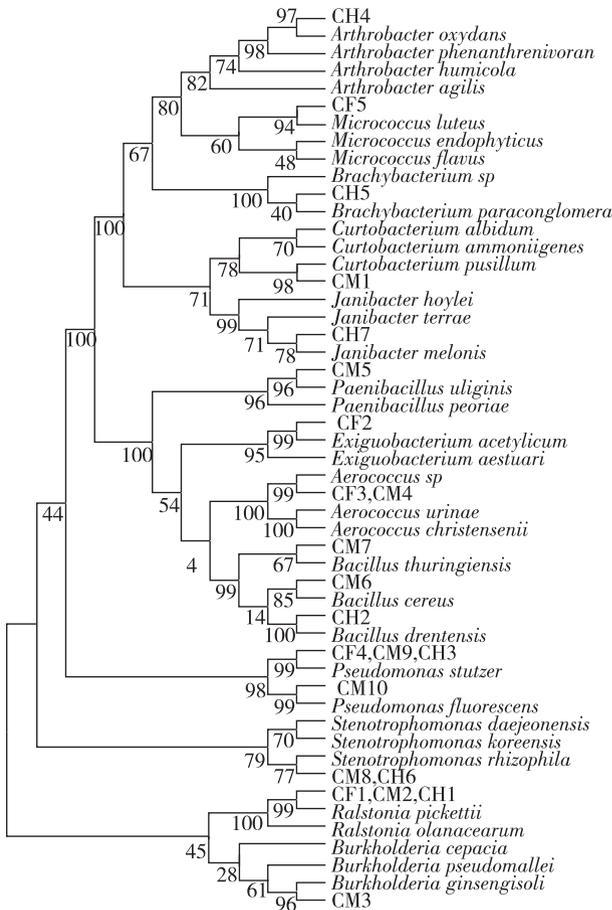


图 2 仁扇舟蛾幼虫肠道细菌的 16S rDNA 的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rDNA phylotypes of the intestinal bacteria of *Clostera restituta* larvae

- in structure and function[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(5): 699-735. DOI:10.1111/1574-6976.12025.
- [2] MORAN N A, PLAGUE G R, SANDSTROM J P, et al. A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(S 2): 14543-14548. DOI:10.1073/pnas.2135345100.
- [3] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- [4] SHIN S C, KIM S H, YOU H, et al. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling[J]. *Science*, 2011, 334(6056): 670-674. DOI: 10.1126/science.1212782.
- [5] KIKUCHI Y, HAYATSU M, HOSOKAWA T, et al. Symbiont-mediated insecticide resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(22): 8618-8622. DOI:10.1073/pnas.1200231109.
- [6] BUCHON N, BRODERICK N A, CHAKRABARTI S, et al. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(19): 2333-2344. DOI:10.1101/gad.1827009.
- [7] DILLON R J, VENNARD C T, CHARNLEY A K. A Note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92(4): 759-763. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01581.x.
- [8] SHARON G, SEGAL D, RINGO J M, et al. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(46): 20051-20056. DOI: 10.1073/pnas.1009906107.
- [9] BERASATEGUI A, SALEM H, PAETZ C, et al. Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness[J]. *Mol Ecol*, 2017, 26(15): 4099-4110. DOI: 10.1111/mec.14186.
- [10] 刘群, 常虹, 陈娟, 等. 分月扇舟蛾与仁扇舟蛾的形态学和生物学区别及其进化关系[J]. *林业科学*, 2014, 50(1): 97-102. LIU Q, CHANG H, CHEN J, et al. Identification of *Clostera anastomosis* and *C. restituta* (Lepidoptera: Notodontidae) by morphological and biological characters and their evolutionary relationship[J]. *Sci Silvae Sin*, 2014, 50(1): 97-102. DOI:10.11707/j.1001-7488.20140115.
- [11] 郑茂灿, 吴小芹, 钱范俊, 等. 上海地区分月扇舟蛾生物学特性和发生规律[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2006, 30(3): 117-120. ZHENG M C, WU X Q, QIAN F J, et al. Biological character and epidemic law of *Clostera anastomosis* in Shanghai[J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 2006, 30(3): 117-120. DOI:10.3969/j.issn.1000-2006.2006.03.027.
- [12] GU T Z, ZHANG C C, CHEN C Y, et al. Effects of exogenous methyl jasmonate-induced resistance in *Populus × euramericana* 'Nanlin 895' on the performance and metabolic enzyme activities of *Clostera anachoreta*[J]. *Arthropod-Plant Interactions*, 2018, 12(2): 247-255. DOI:10.1007/s11829-017-9564-y.
- [13] GU T Z, HUANG K R, TIAN S, et al. Antennal transcriptome analysis and expression profiles of odorant binding proteins in *Clostera restituta*[J]. *Compar Biochem and Physic: Part D*, 2019, 29: 211-220. DOI:10.1016/j.cbd.2018.12.002.
- [14] 文竹, 姜义仁, 黄伶, 等. 栎黄掌舟蛾幼虫肠道好氧菌群分析及产纤维素酶菌的筛选[J]. *环境昆虫学报*, 2015, 37(6): 1203-1212. WEN Z, JIANG Y R, HUANG L, et al. Analysis of aerobic bacterial population and screening of the cellulose-producing bacteria from larval intestine of *Phalera assimilis*[J]. *J Environ Entomol*, 2015, 37(6): 1203-1212. DOI:10.3969/j.issn.1674-0858.2015.06.12.
- [15] PANIAGUA VOIROL L R, FRAGO E, KALTENPOTH M, et al. Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 556-570. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00556.
- [16] SNYMAN M, GUPTA A K, BEZUIDENHOUT C C, et al. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(7): 115-124. DOI:10.1007/s11274-016-2066-8.
- [17] BRODERICK N A, RAFFA K F, GOODMAN R M, et al. Census of the bacterial community of the Gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 293-300. DOI: 10.1128/aem.70.1.293-300.2004.
- [18] BOECKLER G A, TOWNS M, UNSICKER S B, et al. Transgenic upregulation of the condensed tannin pathway in poplar leads to a dramatic shift in leaf palatability for two tree-feeding Lepidoptera[J]. *J Chem Ecol*, 2014, 40(2): 150-158. DOI:10.1007/s10886-014-0383-7.
- [19] BHAT T K, SINGH B, SHARMA O P. Microbial degradation of tannins: a current perspective[J]. *Biodegradation*, 1998, 9(5): 343-357. DOI:10.1023/a:1008397506963.

(责任编辑 王国栋)