

思茅松毛虫四龄幼虫肠道好氧细菌的 ARDRA 分析及鉴定^{*}

孙佑赫^{**} 熊 智 王金华^{***} 张武先 王海林

(西南林业大学 昆明 650224)

摘 要 从思茅松毛虫 *Dendrolimu kikuchii* Matsumura 4 龄幼虫肠道环境中分离、纯化、培养, 获得 11 株好氧细菌菌株。以细菌基因组 DNA 为模板, 用细菌通用引物 (27f、1492r) 对模板进行 PCR 扩增, 并用 4 种限制性内切酶 *Hae* III、*Hind* III、*Hinf* I、*Taq* I 对 PCR 产物进行 ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) 多态性分析, 在 84% 的相似水平上可分成 6 大类群, 多样性丰富。对 6 大类群的代表菌株进行 16S rDNA 序列测定, 分析表明: 分离到的 11 株好氧细菌中 4N05、4N08 和 4N11 归属克雷伯氏杆菌属 (*Klebsiella* sp.), 4N02 归属 *Lysinibacillus* 属; 4N03 和 4N09 确定到种, 分别是 γ -变形杆菌 (*Gamma proteobacterium*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* strain); 4N04、4N06、4N07 和 4N01、4N10 也可以确定到种, 其中前 3 株是短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis* strain), 后 2 株是沼泽短芽孢杆菌 (*Brevibacillus limnophilus* strain), 并且这 5 株菌都归属短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.)。通过研究, 既可以为松毛虫的生物防治提供微生态理论依据, 又丰富了微生物资源库。

关键词 思茅松毛虫, 肠道好氧细菌, 多样性, ARDRA, 鉴定

Amplified ribosomal DNA restriction analysis and identification of intestinal aerobic bacteria from 4th instar larva of *Dendrolimu kikuchii*

SUN You-He^{**} XIONG Zhi WANG Jin-Hua^{***} ZHANG Wu-Xian WANG Hai-Lin

(Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract 11 strains of aerobic bacteria were isolated from the intestine of *Dendrolimu kikuchii* Matsumura using the plating method. Bacterial genomic DNA was used as templates. A new method of analyzing the genetic diversity of intestinal aerobic bacteria was established using the PCR technique (primer 27f, 1492r) and ARDRA patterns, which used enzyme digestion (*Hae* III and *Hind* III, *Hinf* I and *Taq* I) of cloned 16S rDNA gene sequences. The results show that 11 strains could be divided into 6 groups at a similarity level of 84%. The results prove that *Dendrolimu kikuchii* has a genetically diverse, aerobic, intestinal bacterial fauna. Analysis of full-length 16S rDNA sequences from representative strains of the identified bacterial groups showed that these strains belong to *Klebsiella* sp. (4N05, 4N08 and 4N11), *Lysinibacillus* sp. (4N02), *Gamma proteobacterium* (4N03), *Bacillus subtilis* strain (4N09), *Brevibacillus* sp. (4N04, 4N06, 4N07, 4N01 and 4N10). This study provides a theoretical basis for the microbiological control of *Dendrolimu kikuchii* and enriches the microbial resources library.

Key words *Dendrolimu kikuchii*, intestinal aerobic bacteria, diversity, ARDRA, identification

思茅松毛虫 *Dendrolimu kikuchii*, 又名赭色松毛虫, 鳞翅目 (Lepidoptera) 枯叶蛾科

* 资助项目: 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金 (ZK09A102)、国家自然科学基金 (31100007)。

** E-mail: sunyouhe2006@126.com

*** 通讯作者, E-mail: jinhuaawang@swfu.edu.cn

收稿日期: 2011-08-25, 接受日期: 2011-09-20

(Lasiocampidae) 松毛虫属 (*Dendrolimus*), 1927 年日本昆虫分类学家松村松年 (Matsumura) 根据在云南思茅采得的标本定名, 主要分布于江西、云南、福建、安徽、浙江等省。在云南, 思茅松毛虫年生 1~2 代, 幼虫 5~7 龄, 分布于安宁、思茅、景东、德宏等地, 主要危害思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)、云南松 (*P. yunnanensis*)、马尾松 (*P. massoniana* Lambert) 及云南油杉 (*Keteleeria evelyniana*) 等树种 (侯陶谦, 1987)。松毛虫是中国四大林业食叶害虫之一, 全世界已知 29 种, 除欧洲松毛虫 *D. pini* 和巴基斯坦松毛虫 *D. benderi* 外, 中国产 27 种, 在中国平均每年发生面积有 133~266 万 hm^2 , 可使大面积松林枝叶枯干死亡, 被称为“无烟的森林火灾” (曾菊平和戈峰, 2010)。

影响昆虫生命活动的外界环境因素, 如温度、湿度、光照、食物等因素的研究较多, 但对昆虫肠道微生物的研究与阐述较少 (北京农业大学, 1993)。昆虫肠道微生物与昆虫的营养、免疫、生命活动密切相关, 并与昆虫有共同进化的关系 (相辉和黄勇平, 2008)。迄今为止, 国内外已经对人和一些家禽家畜的肠道微生态进行了较为系统的研究, 并研制了许多微生态制剂来建立良好的微生态环境。而对于自然界中最具代表性的生物类群——昆虫, 其肠道微生态的研究相对较少。目前对白蚁 (Ohkuma and Kudo 1996; Koenig *et al.*, 2002) 和家蚕 (易发平等, 2001; 张剑飞等, 2002) 有比较全面的研究, 随着微生物多样性研究技术的进步和微生态理论及实践范围的扩大, 近年来对昆虫肠道微生物的研究逐步活跃起来, 对斑衣蜡蝉 (刘玉升等, 2006a)、黑粉虫 (刘玉升等, 2006b)、黄粉虫 (张丽等, 2006)、东亚飞蝗等几种昆虫的肠道微生物做了基础性研究。

本实验对思茅松毛虫 4 龄幼虫的肠道微生物进行了分离、培养及鉴定, 重点研究了肠道好氧细菌, 为揭示思茅松毛虫幼虫肠道微生物的种类及进一步探讨其对思茅松毛虫生命活动的影响奠定基础, 同时, 发掘和丰富微生物资源库。

1 材料与方法

1.1 昆虫样品

采自云南省思茅市宁洱县磨黑镇 12 年生思茅松纯林的健康 4 龄幼虫。

1.2 培养基与主要试剂

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 20 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 值 7.0~8.0, DNA 提取试剂盒 (天根公司), 2 × Power Taq PCR MasterMix (BIOTEKE 公司), 限制性内切酶 *Hae* III、*Hind* III、*Hinf* I、*Taq* I (宝生物工程有限公司), 100 bp Ladder DNA Marker (博迈德生物), 其他试剂均为分析纯。

1.3 细菌的分离和纯化

试验中松毛虫 4 龄幼虫仅用无菌水饲养 3 d, 排尽其肠道食物。将虫体于 0.1% 升汞溶液中浸泡 5 min 后, 用无菌水清洗虫体, 然后在蜡盘中进行无菌解剖。取其中肠道, 在无菌研钵中研磨, 将研磨液用无菌水稀释至 10^{-1} ~ 10^{-8} 。分别取各个稀释度的混悬液 0.2 mL, 在牛肉膏蛋白胨培养基上进行涂布分离, 各稀释度重复 3 次, 于 28℃ 培养箱中黑暗培养 72 h。挑取所有的单菌落划线纯化, 镜检至纯菌株后斜面 4℃ 保存。

1.4 16S rDNA 基因扩增及酶切分析

1.4.1 菌体总 DNA 提取 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取好氧细菌单菌落的基因组 DNA。

1.4.2 16S rDNA 基因扩增引物

正向引物 27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';

反向引物 1492r: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。

1.4.3 16S rDNA PCR 扩增体系及条件 体系: 2 × Power Taq PCR MasterMix 25 μL , 正反引物各 2 μL , DNA 模板 1 μL , 无菌水补足 50 μL 。

条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4.4 ARDRA 分析 取 10 μL PCR 扩增产物, 分别用 *Hae* III、*Hind* III、*Hinf* I、*Taq* I 4 种限制性内切酶进行酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后用显微成像系统进行拍照和记录。用软件 TotalLabTL100 将 DNA 带谱进行编码, 按“出现”记为 1, “不出现”记为 0, 进行编码, 模糊条带及分子量小于 100 bp 的条带忽略不计, 使用 MVSP 软件构建聚类树。

1.5 16S rDNA 全序列分析

根据 ARDRA 聚类结果,选取典型代表菌株,各取 16S rDNA PCR 扩增产物,送华大基因公司测序。

1.6 同源性比对及系统发育树的构建

登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 利用 BLAST 程序将所测序列与 GenBank 中的已知序列进行比对,查找高相似性序列,用 Clustal X 程序按照最大同源性的原则进行排序,并使用 MEGA 软件的 Neighbor-Joining 法生成系统发育树。

2 结果与分析

2.1 好氧细菌的分离

思茅松毛虫 4 龄幼虫中肠肠道匀浆悬液经倍比稀释涂布培养后,共分离得到 11 株好氧细菌,编号 4N01 ~ 4N11。

2.2 16S rDNA 扩增

通用引物对 11 株细菌样品的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,得到重复性好、稳定清晰的特异扩增片段,长度约 1 500 bp (图 1)。

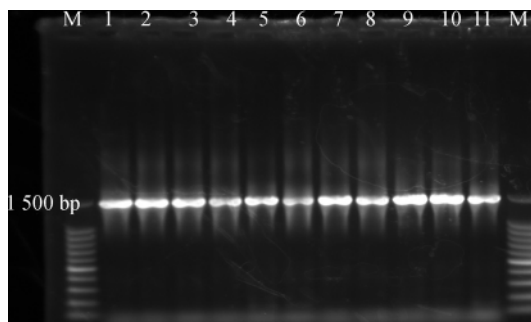


图 1 思茅松毛虫 4 龄幼虫肠道好氧细菌基因组的 16S rDNA 扩增图谱

Fig. 1 16S rDNA amplification results of genome of intestinal aerobic bacteria of *Dendrolimu kikuchii*

泳道 M 是 100 bp ladder DNA marker; 泳道 1 ~ 11 分别是菌株 4N01 ~ 4N11。

Lane M, 100 bp ladder DNA marker; lane 1 – 11 are strains 4N01 – 4N11, respectively.

2.3 ARDRA 分析

用 *Hae* III、*Hind* III、*Hinf* I、*Taq* I 4 种限制性内切酶对 PCR 产物进酶切,经电泳产生了丰富的带谱类型 (图 2: A, B)。由酶切图谱可见, *Hae* III 和 *Hind* III 的酶切图谱有 a、b、c、d、e、f 共 6 种谱带类型,而 *Hinf* I 和 *Taq* I 的酶切图谱有 g、h、i、j 共 4 种谱带类型。所以 *Hae* III 和 *Hind* III 的酶切图谱带型更丰富,对 11 个样品菌株的区分力较强,较适用于思茅松毛虫幼虫肠道好氧细菌的鉴定。

寡位点酶组合 (*Hae* III + *Hind* III) 和多位点酶组合 (*Hinf* I + *Taq* I) 分别对得到的肠道好氧细菌进行酶切后,均不能充分反映思茅松毛虫 4 龄幼虫的肠道微生物多样性,寡位点酶和多位点酶的酶切结果结合后才能更好的反映其多样性。

根据 4 种酶切结果,平均连锁聚类法 (UPGMA) 聚类结果见图 3。

由图 3 可以看出,11 株菌在同源性 84% 的水平上分为 6 大类群,表现出了丰富的多样性。据

此,在本研究中,所分离到的 11 株肠道好氧细菌中,可能存在 6 种不同的细菌种群。

2.4 16S rDNA 基因序列分析

将 6 大类群的典型代表菌株 4N02、4N03、4N04、4N08、4N09、4N10 测序,所得序列在 GenBank 数据库中作比对分析,并对它们及其在 GenBank 中的最相似的序列构建系统发育树 (图 4)。测序的 6 个菌株与其在 GenBank 中的相似序列的相似性均大于 97%。结果表明,4N02 归属 *Lysinibacillus* 属,4N08 归属克雷伯氏杆菌属 (*Klebsiella* sp.); 4N03 和 4N09 可以确定到种,分别是 γ -变形杆菌 (*Gamma proteobacterium*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* strain), 4N04 和 4N10 也可以确定至种,分别是短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis* strain) 和沼泽短芽孢杆菌 (*Brevibacillus limnophilus* strain), 而且两者同属短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.)。由此可见,思茅松毛虫 4 龄幼虫的肠道细菌的多样性是比较丰富的。结合图 3

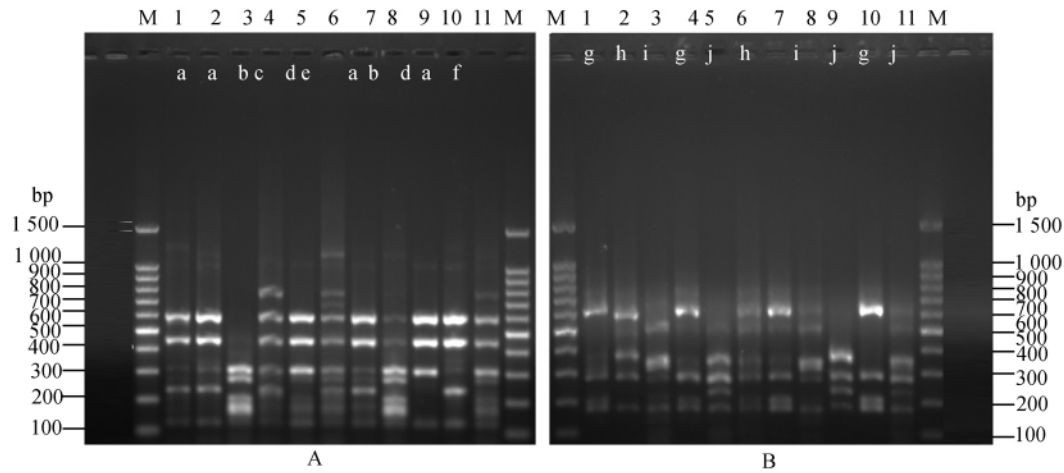


图 2 思茅松毛虫 4 龄幼虫 *Hae* III 和 *Hind* III (A) 及 *Hinf* I 和 *Taq* I (B) 酶切 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 16S rDNA agarose gel electrophoresis map of 4th instar larva of *Dendrolimu kikuchii* digested by *Hae* III + *Hind* III (A) and *Hinf* I + *Taq* I (B)

泳道 M 是 100 bp ladder DNA marker; 泳道 1 ~ 11 分别是菌株 4N01 ~ 4N11; a ~ j 表示不同电泳带型。

Lane M, 100 bp ladder DNA marker; lane 1 - 11 are strains 4N01 - 4N11, respectively; a-j are different band type.

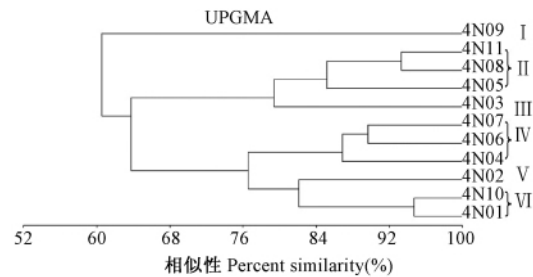


图 3 思茅松毛虫 4 龄幼虫肠道好氧细菌的同源性树状图

Fig. 3 Clustering tree of intestinal aerobic bacteria of 4th instar larva of *Dendrolimu kikuchii*

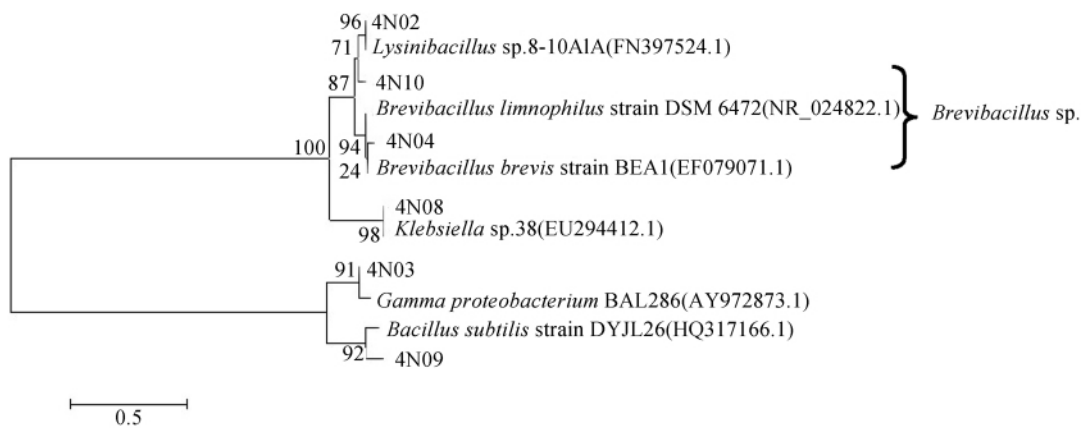


图 4 以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树状图

Fig. 4 Phylogenesis dendrogram on the basis of 16S rDNA complete sequence

的同源树, 得出短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.) 是 45.45%。优势种群, 包括 4N01、4N10、4N04、4N06、4N07, 占

3 讨论

昆虫的多样性使得昆虫肠道微生物也具有丰富的多样性。昆虫肠道微生物的多样性与昆虫肠道的特殊结构和环境因素如肠道的 pH 值以及昆虫的取食食料有密切的关系(相辉和黄勇平, 2008)。

昆虫肠道结构是影响微生物群落结构的一个重要因素。鳞翅类昆虫和蝗虫的肠道较直, 结构也比较简单, 这类昆虫的肠道微生物多样性较低(张武先等, 2011)。而具有复杂肠道结构的昆虫, 如等翅目白蚁, 其肠道微生物多样性较高(Tanada and Kaya, 1993)。

肠道 pH 值的不同, 其适合生长的细菌种类就会有很大差别。如鳞翅目昆虫的肠道 pH 值 8~10, 属于碱性环境, 这种环境下适宜嗜碱细菌肠球菌属(*Enterococcus*)的生存(Xiang *et al.*, 2006)。

食物对肠道微生物的影响比较复杂。Broderick 等(2004)比较不同食物对一种舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫中肠微生物的影响, 发现不同的食物饲养的幼虫肠道微生物组成有明显的区别, 不过肠球菌属(*Enterococcus*)和一种肠杆菌(*Entbacter* sp.)的存在却不受食料的影响。而出现这种现象的原因还尚不清楚。

以取食松针为主的思茅松毛虫, 其肠道微生物的类群与其食物有密切的关系。从思茅松毛虫 4 龄幼虫肠道里分离、纯化的 11 株好氧细菌分属于 *Lysinibacillus* 属、 γ -变形杆菌、短芽孢杆菌属、克雷伯氏杆菌属、枯草芽孢杆菌, 它们在肠道内形成的微生物生态系统能帮助摄食和消化, 维护松毛虫暴食期的健康。

松毛虫作为一种森林害虫, 对它的预防和治疗是一个很重要的课题, 因此, 研究松毛虫的肠道微生态并研制微生态制剂, 对于加强松毛虫的生物防治有重要意义。研究尚需进一步的对思茅松毛虫幼虫的肠道微生物做系统的研究, 以期研制出理想的微生态制剂, 从而有效地减小松毛虫的危害。

参考文献(References)

- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1):293—300.
- Koenig H, Froehlich J, Berchtold M, Wenzel M, 2002. Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites. *Recent. Res. Devel. Microbiol.*, 6:125—156.
- Ohkuma M, Kudo T, 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2):461—468.
- Tanada Y, Kaya HK, 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, New York. 12—51.
- Xiang H, Wei GF, Jia SH, Huang JH, Miao XX, Zhou ZH, Zhao LP, Huang YP, 2006. Microbial communities in midgut of indoor and wild population of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol.*, 52(11):1085—1092.
- 北京农业大学, 1993. 昆虫学通论. 北京: 农业出版社. 472—474.
- 曾菊平, 戈峰, 2010. 我国林业重大害虫松毛虫的灾害研究进展. *昆虫知识*, 47(3):451—459.
- 侯陶谦, 1987. 中国松毛虫. 北京: 科学出版社. 32—34.
- 刘玉升, 陈艳霞, 吕飞, 何华, 2006a. 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究. *山东农业大学学报*, 37(4):495—498.
- 刘玉升, 刘丽, 张静, 2006b. 黑粉虫幼虫肠道细菌的研究. *中国微生态学杂志*, 12(18):471—473.
- 相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. *昆虫知识*, 45(5):687—693.
- 易发平, 王林玲, 周成, 陈家莲, 张健飞, 周泽扬, 2001. 蚕肠道好氧微生物菌群的研究. *西南农业大学学报*, 23(2):117—119.
- 张剑飞, 王林玲, 周泽扬, 2002. 家蚕 K_{100} 、 E_{32} 肠道微生物初探. *四川蚕业*, 30(3):8—12.
- 张丽, 刘玉升, 刘大伟, 何华, 吕飞, 2006. 黑粉虫与黄粉虫幼虫肠道细菌的比较. *华东昆虫学报*, 15(1):17—21.
- 张武先, 刘丽, 王金华, 刘朝梅, 2011. 疣蝗肠道好氧细菌的分离及 ARDRA 多态性分析. *农业科技与信息*, (7):29—31.