

五龄恩茅松毛虫幼虫的肠道好氧细菌多样性分析^{*}

王金华^{1,2**} 李彪³ 张武先^{1***} 熊智¹ 赵丽芳¹ 王海林¹

(1. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室 昆明 650224;

2. 云南农业大学植物保护学院 昆明 650201; 3. 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司 昆明 650106)

摘要 采用 16s rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 16s rDNA 扩增片段经寡位点酶组合(*Hae* III + *Hind* III)和多位点酶组合(*Hinf* I + *Taq* I)酶切后得到 ARDRA 指纹图谱, ARDRA 指纹图谱通过 MVSP 软件进行聚类分析(UPGMA), 并对 5 大类群的代表菌株进行测序, 研究了 5 龄恩茅松毛虫 *Dendrolimu kikuchii* Matsumura 肠道细菌的多样性。结果表明:寡位点酶组合(*Hae* III + *Hind* III)或多位点酶组合(*Hinf* I + *Taq* I)酶切得到的 ARDRA 指纹图谱不能反映 5 龄恩茅松毛虫肠道细菌的多样性, 两组酶切结果组合后可以充分反映 5 龄恩茅松毛虫肠道细菌的多样性。通过测序可知, 5 龄恩茅松毛虫的肠道内主要定植产酸克雷伯氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)、雷金斯堡约克氏菌(*Yokenella regensburgei*)、克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 多样性丰富, 它们形成的肠道微生物生态系统可以抵制外来菌对恩茅松毛虫的侵害, 维持恩茅松毛虫的健康。

关键词 恩茅松毛虫, 肠道细菌, 多样性, 鉴定

Analysis of the diversity of intestinal aerobic bacteria from the 5th instar larvae of *Dendrolimu kikuchii*

WANG Jin-Hua^{1,2**} LI Biao³ ZHANG Wu-Xian^{1***} XIONG Zhi¹
ZHAO Li-Fang¹ WANG Hai-Lin¹

(1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Yunnan Reascend Tobacco Technology(Group) CO. LTD. , Kunming 650106, China)

Abstract In order to investigate the diversity of the intestinal aerobic bacteria of the 5th instar larvae of *Dendrolimus kikuchii* Matsumura the characteristic ARDRA fingerprint of the larvae's intestinal bacteria was obtained by amplifying 16S rDNA with a general primer and digesting the 16S rDNA PCR amplicon (about 1.5 kb) with four restriction enzymes (*Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I and *Taq* I). ARDRA patterns were analyzed by MVSP software using the UPGMA method, and the full complement of 5 representative strains' 16S rDNA were sequenced and blasted in GenBank. Although a few enzyme combinations (*Hae* III + *Hind* III and *Hinf* I + *Taq* I) could not completely digest the 16S rDNA PCR amplicon, the diversity of intestinal bacteria could be inferred from the results obtained from all four restriction enzymes. The results of phylogenetic analysis based on sequencing show that intestinal aerobic bacteria from the 5th instar larvae of *D. kikuchii* include *Klebsiella oxytoca*, *Yokenella regensburgei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* and *Bacillus thuringiensis*. This diverse intestinal microbial ecosystem may help protect larvae from invasion by invasive pathogenic bacteria.

Key words *Dendrolimus kikuchii*, gut microbiology, diversity, identification

^{*} 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); 西南林业大学大型仪器设备共享平台资助。

^{**} E-mail: jinhuaawang@swfu.edu.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: 46639881@qq.com

收稿日期: 2011-07-10, 接受日期: 2011-08-26

思茅松毛虫 *Dendrolimu kikuchii* Matsumura, 又名赭色松毛虫, 鳞翅目 (Lepidoptera) 枯叶蛾科 (Lasiocampidae) 松毛虫属 (*Dendrolimus*), 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 7 龄, 以 4 龄幼虫过冬, 分布于安宁、思茅、景东、德宏等地, 主要危害思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis* (A. Chev) Gaussen)、云南松 (*Pinus yunnanensis faranch*)、云南油杉 (*Keteleeria evelyniana* Mast) 及马尾松 (*P. massoniana* Lambert) 等树种, 是云南省思茅松的主要害虫 (中国科学院动物研究所, 1979), 被称为“无烟火灾” (Gninenko and Orlinskii, 2002; LeMellec and Michalzik, 2008)。松毛虫大量爆发时其毒毛易使人致病 (如关节肿大)、致残、致盲等 (王寅威和姜素贞, 1999)。目前国内外对松毛虫的研究主要表现在对其防治方面 (Bogus *et al.*, 2007; 徐学山, 2009; 叶景阳和王存荣, 2010), 也有对其营养价值的研究报道 (童清和何剑中, 2010), 但其肠道微生物的研究未见报道。

思茅松毛虫的肠道环境是一个很复杂的微生物生态系统, 其复杂性归因于松毛虫的不同生理特性、取食和健康状况 (Moselio, 2006; 孙佑赫等, 2012)。5 龄松毛虫的肠道里面共生着许多微生物, 使得松毛虫进行着活跃的新陈代谢活动, 对寄主的健康起到了很大的作用。动物肠道菌群对蛋白质有双重调节作用、对淀粉有显著的消化作用, 并能对动物生长提供能量、提供挥发性脂肪酸、合成维生素, 还能促进矿质元素的吸收 (温俊等, 2010)。目前已有日本龟蜡蚧 (贝绍国等, 2005)、黑粉虫与黄粉虫幼虫 (张丽等, 2006)、中华真地鳖若虫 (刘玉升等, 2007b)、东亚飞蝗 (刘玉升等, 2007a)、豆天蛾幼虫 (吕飞和刘玉升, 2009) 和文山松毛虫 (陈世雄等, 1998) 等昆虫肠道微生物的相关研究, 但松毛虫肠道微生物的针对性研究未见报道。扩增 rDNA 限制性酶切片段分析法 (amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 是将 PCR 技术和 RFLP 技术相结合衍生的分子技术 (Vanechoutte and Rudi, 1992), 本文利用 ARDRA 相关技术研究了 5 龄思茅松毛虫幼虫肠道细菌菌群的多样性, 为研究昆虫肠道菌群与寄主的关系提供依据, 对松毛虫的防治以及微生物资源的开发具有理论意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

思茅松毛虫 5 龄幼虫采集自普洱市景东县思茅松林内, 采集虫体后放入细孔铁丝网笼, 并在网笼内放置新鲜松针, 当天带回实验室。

NA 培养基: CMC-Na 20 g; Na₂HPO₄ 2.5 g; KH₂PO₄ 1.5 g; 蛋白胨 2.5 g; 琼脂 20 g; 蒸馏水 1 000 mL; pH 7.0~7.5。

1.2 实验方法

1.2.1 肠道细菌的分离 将林间采集的健康思茅松毛虫 5 龄幼虫用清水饲喂 2~3 d 至肠道内含物排净, 用 75% 酒精擦拭清洁体表 10 s, 再用 0.1% 升汞擦拭消毒 10 s, 无菌水冲洗 4 次。在无菌条件下将上述处理的最后 1 次冲洗无菌水平板涂布在 NA 培养基上, 检测虫体表消毒是否彻底。

用无菌滤纸吸干消毒后的幼虫体表水分, 在无菌条件下解剖松毛虫, 取肠道, 测 pH 值后, 于灭菌研钵中磨碎 (加入 2 mL 无菌水), 将匀浆上清液按 10 倍梯度倍比稀释后, 各取 0.5 mL 涂布于 NA 平板上。置于 25℃ 恒温箱中黑暗培养。待涂布平板上长出菌落后挑取菌株, 转接于新鲜 NA 平板上, 直至没有新菌落再出现。纯化后的菌株转入斜面 4℃ 保存。所有试验重复 3 次。

1.2.2 DNA 的提取 DNA 的提取用细菌 DNA 提取试剂盒 (上海天根公司)。

1.2.3 16S rDNA 扩增 ①引物选择: 正向引物: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3'; 反向引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC C-3' (Weisburg *et al.*, 1999) (由上海生工生物工程有限公司合成)。②反应体系: 正向引物 10 μmol/L; 反向引物 10 μmol/L; PCR MixMaster 25 μL (由北京百泰克生物技术有限公司提供); DNA 模板 2.5 ng; 灭菌水补至 50 μL。③反应程序: 预变性: 94℃ 5 min; 变性: 94℃ 1 min, 退火: 56℃ 1 min, 延伸: 72℃ 3 min, 30 个循环; 终延伸: 72℃ 5 min。④PCR 产物检测: PCR 产物 5 μL 用 EB 染色的浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪照相。

1.2.4 16S rDNA 限制性酶切 本实验用了 4 种限制性内切酶, 首先用寡位点酶组合 (*Hae* III + *Hind* III) 对上述的 16S rDNA 扩增产物进行酶切,

其反应体系为:*Hae* III 15 U;*Hind* III 15 U;10 × mol·L⁻¹ Buffer 2 μL;DNA 10 μL (≤1 μg);灭菌水补充到 20 μL。37℃ 下过夜酶切后,用 EB 染色的浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶分离酶切片段。其次用多位点酶组合(*Hinf* I + *Taq* I)对上述的 16S rDNA 进行酶切,其反应体系为:*Hinf* I 15 U;*Taq* I 15U;10 × *Taq* I Basal Buffer 2 μL;0.1% BSA 2 μL;DNA 10 μL (≤1 μg);灭菌水补充到 20 μL。37℃ 下反应 2~3 h 后再于 65℃ 下反应 2 h,用 EB 染色的浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶分离酶切片段。

1.2.5 数据分析 用 Total Lab TL100 凝胶图像分析软件对琼脂糖凝胶电泳图谱进行分析,将电泳图谱上出现的 DNA 按“出现”记为 1,“不出现”记为 0,进行统计(小于 100 bp 的片断比较模糊,难以估算它们的片断大小,所以在本试验中未被考虑),最后用 MVSP 软件构建树状聚类图。

1.2.6 测序 根据聚类结果选择典型代表菌株,取 16S rDNA PCR 产物 30 μL 送华大基因测序。

2 结果与分析

2.1 肠道细菌分离结果

经过分离纯化,从 5 龄思茅松毛虫幼虫肠道中得到 10 株菌,编号为:5I01、5I02、5I03、5I04、5I05、5I06、5I07、5I08、5I09 和 5I10。通过 pH 值的

测定,得知 5 龄思茅松毛虫的肠道 pH 值为 7.2,呈中性。

2.2 核糖体 DNA 酶切(ARDRA)结果

将 10 株肠道菌纯培养物分别制备 PCR 简易模板,扩增近全长的 16S rDNA,结果显示,通用引物对肠道菌的 DNA 进行 16S rDNA 扩增后,均有 1 500 bp 左右的扩增条带(图 1)。

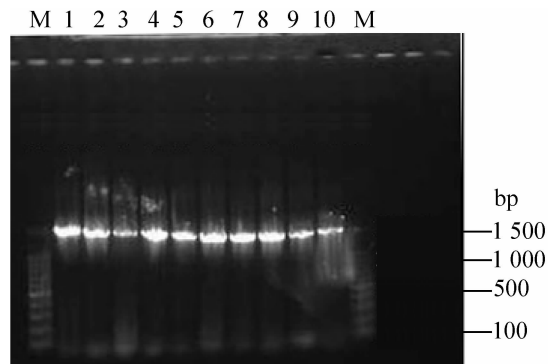


图 1 扩增出的 16S rDNA 片段

Fig.1 The 16S rDNA fragments amplified

M 表示 100 bp DNA ladder,数字表示菌株编号。

M is 100 bp DNA ladder, the digit showing strains number.

将扩增得到的核糖体 DNA 用限制性内切酶消化后的酶切图谱见图 2。

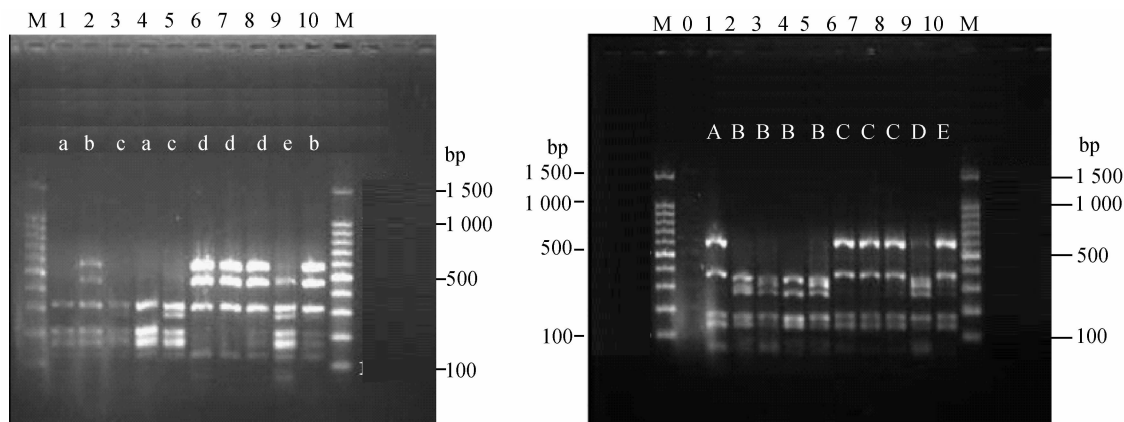


图 2 肠道细菌的 16S rDNA PCR 产物经 *Hind* III、*Hae* III (左)及 *Hinf* I、*Taq* I (右)酶切后的电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNAs digested with *Hind* III、

Hae III (left) and *Hinf* I、*Taq* I (right) from gut flora

M 表示 100 bp DNA ladder,其他字母(a, b,……;A, B,……)表示不同电泳带型(把酶切后 DNA 片段数目及位置相同的泳道带谱记为一种带型,不同的记为另一种),数字表示菌株编号,右图中 0 号泳道为空白对照。

M is 100 bp DNA ladder, other letters(a, b,……; A, B,……) are different electrophoresis zone type (lanes with same DNA fragments and position are same zone type, otherwise others are different zone type), the digit showing strains number, 0 is CK.

10 株 5 龄思茅松毛虫幼虫肠道细菌的 16S rDNA PCR 产物经寡位点酶组合 (*Hae* III + *Hind* III) 进行酶切后的琼脂糖凝胶电泳图谱 (图 2: 左) 可看出, 供试的 10 株肠道菌酶切后有 5 种电泳带型 (分别是 a、b、c、d、e 5 种带型), 此时所获酶切片段较少, 重复性好, 稀有酶切位点, 无法涵盖所有样本, 不能充分反映 5 龄思茅松毛虫肠道细菌的多样性。所以我们又选了多位点酶组合 (*Hinf* I + *Taq* I) 对 16S rDNA PCR 进行酶切, 结果显示多位点酶组合对 16S rDNA PCR 进行酶切后的琼脂糖凝胶电泳图谱 (图 2: 右) 与多位点酶组合酶切后的有一定差异, 10 株肠道菌有 5 种电泳带

型 (分别是 A、B、C、D、E 5 种带型), 同样所获酶切片段较少, 重复性好, 无法涵盖所有样本, 不能充分反映 5 龄思茅松毛虫肠道菌的多样性。但是寡位点酶和多位点酶酶切结果结合后, 得到的条带丰富, 多态性良好, 基本涵盖了所有样本, 充分反映了 5 龄思茅松毛虫幼虫肠道细菌的多样性。

2.3 聚类与测序结果

将酶切结果通过 UPGMA 聚类 (图 3), 并选取代表菌株测序, 测序结果通过 Blast 比对, 其结果见表 1。

表 1 代表菌株的测序结果
Table 1 The sequencing results of representative strains

代表菌株号 Number of representative strains	GenBank 登录号 GenBank accession number	查询范围 (%) Query coverage	相似度 (%) Percent similarity	类型 Description
5I01	AB273739.1	98	99	<i>Yokenella regensburgei</i>
5I02	AB353046.1	99	99	<i>Klebsiella oxytoca</i>
5I04	AY830396.1	99	99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5I07	EU366370.1	99	95	<i>Bacillus thuringiensis</i>
5I09	AB548831.1	99	99	<i>Citrobacter freundii</i>

由表 1 可知, 5 龄思茅松毛虫的肠道菌包括产酸克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella oxytoca*)、雷金斯堡约克氏菌 (*Yokenella regensburgei*)、克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

从图 3 可以看出, 分离得到的 10 株肠道菌在

80% 的相似水平聚成 5 类, 反映出 5 龄幼虫肠道细菌多样性较为丰富, 造成其多样性丰富的主要原因可能是: 进食量大, 消化所需; 进食同时摄入大量外来微生物, 定植后成为肠道菌群的一份子。图 3 还显示出, 分离得到的 10 株菌大多数属于肠杆菌科的肠道菌, 这些肠道菌在松毛虫肠道内有种群优势, 一般不对松毛虫致病, 还可以抵制外来

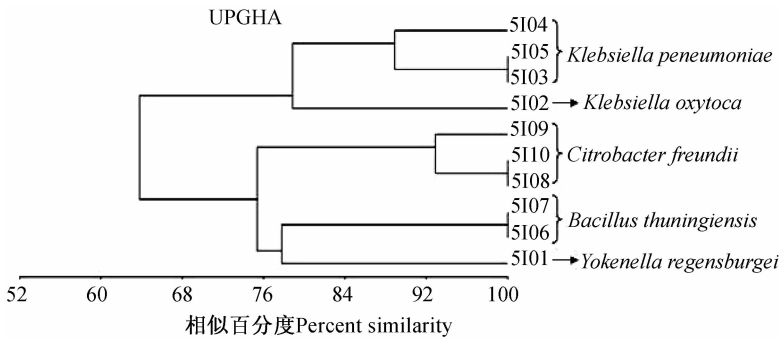


图 3 ARDRA 结果的树状聚类以及测序结果
Fig. 3 The results of ARDRA in dendrogram and sequencing

病原菌对思茅松毛虫的侵害。但是菌株 5106 和 5107 为苏云金芽孢杆菌,是一种杀虫菌,但是它在 5 龄思茅松毛虫的肠道内不占优势(仅占 20%),也没有对 5 龄思茅松毛虫造成杀害,其很可能的原因是由以下几方面:(1)思茅松毛虫吞噬苏云金芽孢杆菌的芽孢和伴孢晶体后,在松毛虫的肠内环境中,产酸克雷伯氏杆菌等一些肠道菌产酸使得肠道局部环境呈酸性,伴孢晶体无法溶解释放出对鳞翅目幼虫有较强毒杀作用的毒素。(2)思茅松毛虫的正常微生物区系阻止了寄主肠道病原菌的新陈代谢,使得非肠道定植菌苏云金芽孢杆菌无法产生有毒的芽孢和伴孢晶体,从而维护了肠道内的微生物生态系统平衡。总之,5 龄思茅松毛虫肠道定植菌群能够抵制致病微生物的侵害,维护肠道微生物生态系统稳定,保护松毛虫的健康。

3 结论

(1)寡位点酶组合(*Hae* III + *Hind* III)和多位点酶组合(*Hinf* I + *Taq* I)对得到的肠道菌进行酶切后,均不能充分反映 5 龄思茅松毛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反映其多样性。

(2)经过 ARDRA 分析得知,5 龄思茅松毛虫的肠道菌在 80% 的相似性水平上聚成 5 类,表现出了丰富的多样性。

(3)5 龄思茅松毛虫的肠道菌主要为产酸克雷伯氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)、雷金斯堡约克氏菌(*Yokenella regensburgei*)、克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*),它们在肠道内形成的微生物生态系统能抵制杀虫菌苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)对思茅松毛虫的杀害,维护思茅松毛虫的健康。

参考文献 (References)

Bogus MI, Kędra E, Bania J, Szczepanik M, Czygier M, Jabłoński P, Pasztaleniec A, Samborski J, Mazgajska J, Polanowski A, 2007. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *J. Insect Physiol.*, 53(9):909 – 922.

Gninenko YI, Orlinskii AD, 2002. *Dendrolimus sibiricus* in

the coniferous forests of European Russia at the beginning of the twenty-first century. *EPPO Bull.*, 32(3):481 – 483.

LeMellec A, Michalzik B, 2008. Impact of a pine lappet (*Dendrolimus pini*) mass outbreak on C and N fluxes to the forest floor and soil microbial properties in a Scots pine forest in Germany. *Can. J. Forest Res.*, 38(7):1829 – 1841.

Moselio S, 2006. The Desk Encyclopedia of Microbiology. Beijing Science Publishing House. 514 – 525.

Vaneechoutte M, Rudi R, 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.*, 93:227 – 234.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. Lane 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2):697 – 703.

贝绍国,刘玉升,崔俊霞,2005. 日本龟蜡蚧肠道细菌分离及鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 36(2):209 – 212.

陈世雄,陈尔厚,索启恒,段兆尧,胡光辉,1998. 文山松毛虫肠道微生物区系及其感染 CPV 后的变化. 中国生物防治, (1):38 – 39.

刘玉升,李明立,刘俊展,郑继法,2007a. 东亚飞蝗肠道细菌的研究. 中国微生态学杂志, 19(1):34 – 39.

刘玉升,叶保华,高庆刚,郑继法,2007b. 中华真地鳖若虫肠道细菌的研究. 中国微生态学杂志, 19(2):158 – 162.

吕飞,刘玉升,2009. 豆天蛾幼虫肠道优势菌株的鉴定研究. 中国微生态学杂志, 21(5):435 – 439.

孙佑赫,熊智,王金华,张武先,王海林,2012. 思茅松毛虫四龄幼虫肠道好氧细菌的 ARDRA 分析及鉴定. 应用昆虫学报,49(6):1618 – 1622.

童清,何剑中,2010. 云南省 4 种松毛虫营养价值的评价. 东北林业大学学报,38(4):98 – 101.

王寅威,姜素贞,1999. 松毛虫所致眼部损伤的研究. 眼外伤职业眼病杂志,21(3):187 – 188.

温俊,孙冬岩,孙笑非,2010. 肠道菌群的重要性及生态制剂对肠道的调节作用. 饲料研究,2:70 – 72.

徐学山,2009. 松毛虫的防治与利用. 河北林业,4:26.

叶景阳,王存荣,2010. 松毛虫的危害与治理. 国土绿化, 2:45 – 46.

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.

中国科学院动物研究所,1979. 中国主要害虫综合防治. 北京:科学出版社. 1 – 467.