

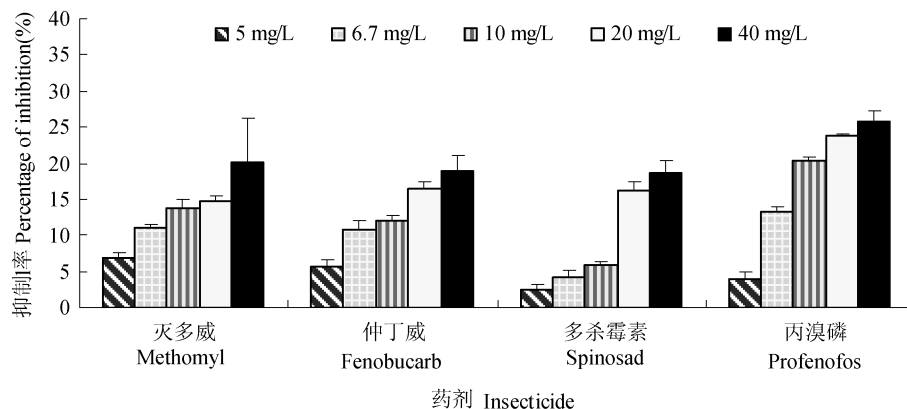


图4 不同药剂对小菜蛾海藻糖酶的体外抑制率

Fig. 4 Inhibited rate of different insecticides on trehalase activity of *Plutella xylostella* (in vitro)

et al., 1975; Lee *et al.*, 2001) 的研究结果有一定的差异。海藻糖酶的最适温度一般比较高, 实验测得小菜蛾海藻糖酶最适温度是 50℃。Park 等 (2008) 对家蝇的研究发现最适温度在 40℃; 鼻白蚁 *Trinervitermes trinervoides* 海藻糖酶的最适温度为 52℃ (Retief and Hewitt, 1973)。本研究结果与其他学者研究结果存在一定的差别, 这可能与酶的来源不同及测定条件的差异有关。在不同底物浓度与海藻糖酶的反应中, 得到的 K_m 为 (12.57 ± 0.99) mmol/L, 比前人报道的家蚕海藻糖酶作用于海藻糖的 K_m (27.8 mmol/L) 低 (王春辉等, 2003), 造成这种差别可能与酶分子结构间的差异有关, 当然, 影响酶与底物结合的速度常数的许多因素也能改变 K_m 值, 例如 pH, 温度和离子强度等。

海藻糖酶是昆虫体内与糖代谢有关的一种重要的酶, 是碳水化合物分解时不可缺少的酶, 可有效调节进入糖酵解与三羧酸循环的底物流量, 以此为体内能量供应提供保障 (Becker *et al.*, 1996; Nath, 2003)。除了参与能量代谢, 在昆虫生殖腺和生殖细胞发育等也起着非常重要的作用 (Ogiso and Takahashi, 1984), 而杀虫剂能够对昆虫海藻糖酶的活性产生一定的影响。测定海藻糖酶等相关碳水化合物关键代谢酶的研究中发现, 植物源 β -葡萄糖苷类化合物七叶灵与皂角苷能显著抑制棉铃虫幼虫中肠海藻糖酶的活性, 饲喂 30 g/L 七叶灵和 40 g/L 皂角苷处理组棉铃虫海藻糖酶比活力分别是对照组的 83.73%、54.21% (于彩虹等, 2011)。高效氯氰菊酯处理亚洲玉米螟卵、1~5 龄幼虫和蛹后, 其海藻糖酶活性均低于对照 (于彩虹

等, 2009)。用拟除虫菊酯类杀虫剂溴氰菊酯处理雄性东亚飞蝗 1 h, 血淋巴中海藻糖的浓度升高 50%, 其浓度的短期上升可能正是由于海藻糖酶的活性受到抑制, 使海藻糖不能被分解为葡萄糖 (Alaoui *et al.*, 1994)。本实验所选用的几种杀虫剂, 对海藻糖酶活性都有一定程度的抑制作用, 其中丙溴磷的抑制率最高, 在浓度为 40 mg/L 时抑制率达到 25.83%。这说明这些药剂与他人研究的结果一样, 同样可以通过对海藻糖酶的抑制作用来影响小菜蛾体内的一系列生理变化。

海藻糖酶作为昆虫体内最为重要的酶系之一, 一直以来我们对其知之甚少, 但随着农作物栽培中高频度、高剂量使用化学杀虫剂防治小菜蛾, 使得小菜蛾长期处于较高的药剂选择压下, 小菜蛾对多种杀虫剂已产生了不同程度的抗药性, 致使许多作用靶标对杀虫剂敏感性下降, 所以近年来海藻糖酶及海藻糖酶抑制剂作为新的开发对象, 越来越受到人们的关注。目前, 对于小菜蛾海藻糖酶及其抑制剂的研究尚鲜有报道, 本实验就海藻糖酶的酶学特性以及常见抑制剂对海藻糖酶的影响做了初步研究, 目的是将小菜蛾的海藻糖酶作为研究新型害虫控制剂的“靶标”, 为以后进一步研究提供了基础。

参考文献 (References)

- Alaoui A, Gourdoux L, Atay ZK, Moreau R, 1994. Alterations in carbohydrate metabolism induced in *Locusta migratoria* after poisoning with the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 50 (3): 183 -

- 190.
- Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5):433–439.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Chang PL, Morrison PE, 1975. Histochemical localization of trehalase activity in dorsal flight muscle of the flesh fly *Sarcophaga bullata* with light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(10):800–807.
- Lee JH, Tsuji M, Nakamura M, Nishimoto M, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Matsui H, Chiba S, 2001. Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(12):2657–2665.
- Nath BS, 2003. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74:73–84.
- Ogiso M, Takahashi SY, 1984. Trehalases from the male accessory glands of the American cockroach: developmental changes and the hormonal regulation of the enzymes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55:387–392.
- Park NJ, Lim HK, Hwang IT, 2008. An enhanced system to screen trehalase inhibitors using a microplate assay with housefly enzyme source. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 11(3):161–166.
- Retief LW, Hewitt PH, 1973. Digestive carbohydrases of the harvester termite *Hodotermes mossambicus*: [α]-glycosidases. *J. Insect Physiol.*, 19(1):105–113.
- Silva MC, Terra WR, Ferreira C, 2004. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(10):1089–1099.
- Silva MCP, Terra WR, Ferreira C, 2006. Absorption of toxic β -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 143:367–373.
- Takahashi K, 1968. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.*, 243:6171–6179.
- Talbot BG, Muir JG, Huber RE, 1975. Properties of a free and a solubilized form of bound α , α -trehalase purified from honey bee thorax. *Can. J. Biochem.*, 53(10):1106–1117.
- Thompson SN, 2003. Trehalose-the insect “blood” sugar. *Adv. Insect Physiol.*, 31:205–285.
- Wegener G, Tschiedel V, Schlöder P, Ando O, 2003. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J. Exp. Biol.*, 206(7):1233–1240.
- Zagrobeyny M, Bak S, Rasmussen AV, Jorgensen B, Naumann CM, Moller BL, 2004. Cyanogenic glucosides and plant-insect interaction. *Phytochemistry*, 65(3):293–306.
- 雷芳, 张桂芬, 万方浩, 马骏, 2006. 寄主转换对 B 型烟粉虱和温室粉虱海藻糖含量和海藻糖酶活性的影响. *中国农业科学*, 39(7):1387–1394.
- 王春辉, 金利群, 郑裕国, 2003. 海藻糖酶的提取及其酶学性质的研究. *中国食品学报*, (z1):6–9.
- 王荫长, 2004. 昆虫生物化学. 北京:中国农业出版社. 53–90.
- 于彩虹, 赵飞, 卢丹, 王晓军, 姜辉, 林荣华, 2009. 高效氯氰菊酯对亚洲玉米螟汰选及海藻糖酶活性的影响. *植物保护学报*, 36(3):257–260.
- 于彩虹, 梁晓贺, 卢丹, 王晓军, 姜辉, 林荣华, 2011. 几种植物源化合物对棉铃虫海藻糖酶活性及相关碳水化合物含量的影响. *昆虫学报*, 54(1):41–49.

小菜蛾幼虫中肠细菌的分离鉴定*

夏晓峰^{1, 2**} 郑丹丹^{1**} 林海兰¹ 尤民生^{1***}

(1. 福建农林大学应用生态研究所 福州 350002; 2. 福州市疾病预防控制中心 福州 350004)

摘要 昆虫中肠微生物在其食物消化、生长发育以及抵御病原菌等方面都具有重要作用。为了深入研究小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 幼虫中肠微生物的群落结构组成和功能, 本文利用传统的微生物培养方法从饲养的小菜蛾 3 龄幼虫中肠分离得到 8 株细菌, 经 16S rDNA 分子鉴定, 分属于 *Serratia* (3 株), *Enterobacter* (3 株), *Stenotrophomonas* (1 株) 和 *Myroides* (1 株) 4 个属, 其中, 7 株菌均归类于 γ -变形菌门 Gamma-proteobacteria, 表明小菜蛾幼虫中肠可培养细菌的优势菌群为 Gamma-proteobacteria。本研究为进一步探讨小菜蛾中肠细菌的群落结构及其功能提供了菌株材料和工作基础。

关键词 小菜蛾, 中肠, 细菌, 16S rDNA, γ -变形菌门

Isolation and identification of bacteria from the larval midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*

XIA Xiao-Feng^{1, 2**} ZHENG Dan-Dan^{1**} LIN Hai-Lan¹ YOU Min-Sheng^{1***}

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Fuzhou Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350004, China)

Abstract The microbiota of insect midguts plays important roles in food digestion, development and the prevention of infestation by pathogens. In order to study the composition, structure and function of bacteria in the midgut of the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.), eight strains of bacteria were isolated from the midguts of 3rd-instar larvae using traditional culture methods. Bacteria from four genera were identified: *Serratia* (3 strains), *Enterobacter* (3 strains), *Stenotrophomonas* (1 strain) and *Myroides* (1 strain), identified by 16S rDNA sequence. In addition, seven strains were identified to be from the phylum of Gamma-proteobacteria, indicating that the DBM larval midgut may be dominated by this taxon of bacteria. Our work provides a foundation for further studies on the structure and function of microbiota in the DBM larval midgut.

Key words *Plutella xylostella*, midgut, bacteria, 16S rDNA, gamma-proteobacteria

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是危害十字花科蔬菜的世界性害虫, 可取食甘蓝、大白菜、萝卜等经济作物, 造成严重的经济损失。农药的大量使用致使小菜蛾对所有的杀虫剂, 包括生物农药 Bt 均产生了抗性, 每年由小菜蛾引起的产量损失和防治费用高达 10 亿美元以上 (Talekar and Shelton, 1993)。

目前, 对小菜蛾的研究主要集中在其生物学和生态学 (Wakisaka *et al.*, 1993; 江丽辉等, 2003;

杨峰山等, 2006)、综合治理 (Reddy and Guerrero, 2000; Shelton and Nault, 2004) 及其基因突变引起的农药抗性 (Lee *et al.*, 2007) 等方面, 然而对小菜蛾中肠细菌的研究却鲜有报道。昆虫中肠是一个重要的器官, 是昆虫分泌消化酶, 进行食物消化吸收的重要场所, 同时由于中肠的特殊生态环境, 其中栖息着大量的共生微生物, 这些共生微生物对昆虫的生长发育、繁殖 (Sharon *et al.*, 2010)、食物消化吸收、抵御外来抗原 (Dillon *et al.*, 2005)、提

* 资助项目: 国家“973”项目 (2011CB100404)。

** 同等贡献, E-mail: bioxxf@163.com

*** 通讯作者, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

收稿日期: 2012-09-23, 接受日期: 2012-11-29

高免疫力、甚至对杀虫剂的抗性均发挥着重要的作用(Broderick *et al.*, 2006)。昆虫中肠微生物与宿主昆虫间有着非常密切的相互影响和制约的关系。一方面,昆虫中肠的微环境影响甚至决定着其肠道内细菌的群落结构及其代谢活动,另一方面,中肠细菌的群落组成及其代谢也反过来作用于宿主,影响宿主的生理代谢(相辉和黄勇平, 2008)。

近年来,随着高通量测序技术的快速发展,昆虫肠道细菌的研究也日益深入,并取得了较传统的微生物分离纯化方法更为丰富的群落结构信息。但新的测序技术只能解析肠道菌群的组成以及初步的代谢途径预测,要想用生物学实验来证明中肠微生物对宿主的作用,仍然需要借助传统的微生物学纯培养方法来获得菌株材料。本研究的目的就是利用传统微生物培养方法从小菜蛾中肠分离细菌,研究小菜蛾中肠可培养细菌的结构组成,同时为下一步利用生物学实验验证小菜蛾中肠微生物的功能提供菌株材料。

1 材料与方法

1.1 小菜蛾的饲养

从福州郊区菜地里采集小菜蛾幼虫,并于实验室萝卜苗上继代饲养 100 代以上,饲养条件为温度(25 ± 2)℃,相对湿度 70%~80%,光照周期为 L:D=16:8。

1.2 中肠内含物的提取

随机选取 50 头生长健康的 3 龄幼虫,75%酒精体表消毒 90 s,蒸馏水漂洗后,无菌条件下解剖小菜蛾幼虫中肠,将中肠内含物溶解于 1 mL 无菌水中混匀备用。

1.3 小菜蛾中肠细菌的分离培养

将上述提取的中肠内含物按照 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 进行稀释涂平板,平板培养基分别为 LB 培养基: 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母抽提物, 10 g NaCl, 15 g 琼脂, 溶于 1 L 无菌水中, 调 pH 至 7.0; 营养琼脂平板 NA: 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 15 g 琼脂, 溶于 1 L 无菌水中, 调 pH 至 7.0; 无机盐培养基 MSM: 1.0 g K_2HPO_4 , 0.3 g KH_2PO_4 , 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g NaCl, 1.0 g NH_4NO_3 , 15 g 琼脂, 添加 0.1 g 毒死蜱, 溶于 1 L 无菌水中, 调 pH 至 7.0。将上述稀释液平板置于 28℃ 培养箱中培

养 72 h, 每 24 h 观察一次。根据菌落的颜色、大小和形态分离纯化单菌落, 每个单菌落至少在 LB 平板上纯化 5 次以得到纯的单克隆菌株, 纯化得到的菌株于 -80℃ 冰箱保存于 25% 的甘油水溶液中备用。

1.4 16S rDNA 基因的扩增

使用上海生物工程有限公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取小菜蛾中肠细菌单克隆菌株基因组 DNA, 以提取的总 DNA 为模板, 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAG-TTTGATCCTGG-CTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 克隆细菌的 16S rDNA。PCR 反应体系为 15 μ L: ddH₂O 10.5 μ L, 10 $\times$ PCR ExTaq Buffer 1.5 μ L, DNA 模板 (50 ng/ μ L) 1.0 μ L, 27F (10 mmol/L) 和 1492R (10 mmol/L) 各 0.5 μ L, dNTP 1.0 μ L, ExTaq (5 U/ μ L) 0.15 μ L。PCR 条件: 95℃ 5 min, (94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min) $\times$ 30 个循环, 72℃ 10 min, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 使用 ABI PRISM 3730 对扩增产物进行测序。

1.5 小菜蛾中肠细菌系统发育分析

将测序得到的 16S rDNA 序列与 NCBI GenBank 数据库进行 blast 比对, 选取各个菌株的近缘序列, 使用 clustalX1.83 进行序列比对, 利用 MEGA5.0 软件(Tamura *et al.*, 2011), 采用邻位相连(Neighbor-Joining)算法构建系统进化树(Saitou and Nei, 1987), 使用 bootstrap 检验进化树的可靠性。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾中肠细菌的分离纯化

分别从 LB、NA 和 MSM 培养平板上挑取大小、形态、颜色不一致的菌落于 LB 平板中分离纯化, 得到 8 株单一的细菌菌落(图 1), LB 纯化平板中, PXG5、PXG8、PXG11 的菌落形态和颜色相近, 均为乳白色菌落, 而 PXG2 则为黄色菌落, 较为粘稠, 不易挑取, PXG1 和 PXG4 为淡黄色菌落, PXG9 菌落形态类似 PXG11, PXG6 则能产生水溶性的色素, 形成红色菌落, 菌体生长后期形成中心红色, 外围变成乳白色的菌落。此外, PXG1, PXG6, PXG9 均能在以毒死蜱为唯一碳源的无机盐培养基 MSM 上生长, 提示该 3 株菌具备降解毒死蜱的能力。

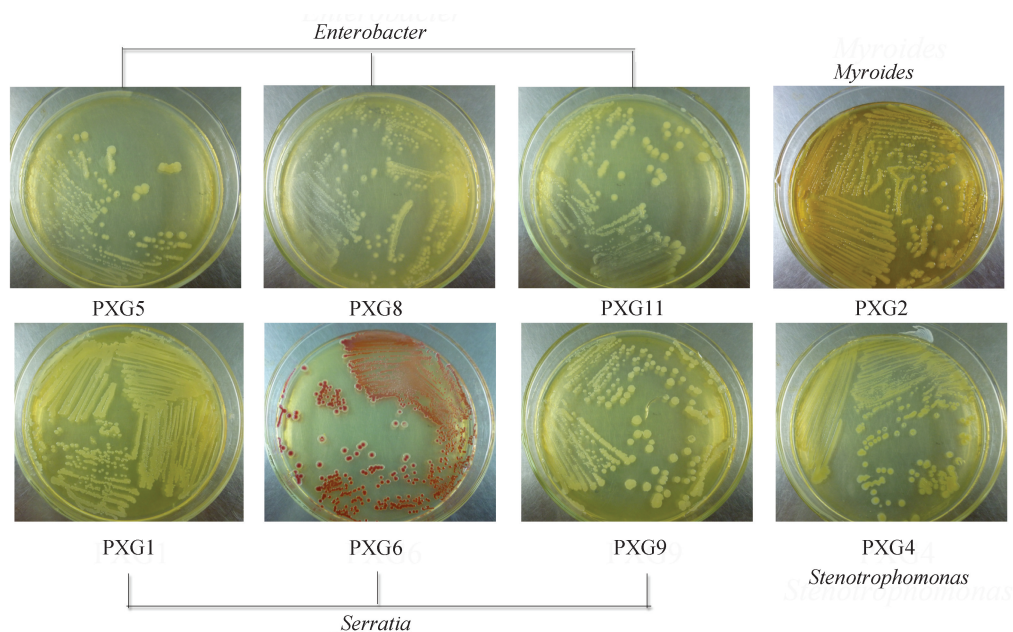


图1 小菜蛾3龄幼虫中肠细菌菌落

Fig.1 Bacteria strains isolated from the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella*

2.2 分离株 16S rDNA 克隆及测序

以提取的细菌基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA(图2,图3),PCR 产物经纯化后送交上海生物工程技术公司测序,得到 8 条不同序列 (GenBank accession number: JQ396385-JQ396391, JQ396393),将序列同 NCBI 数据库进行 blast 比对 (表1)。Blast 比对结合 Ribosomal Database Project

(RDP)数据库 Classifier 分析显示,从小菜蛾中肠分离的 7 株细菌 (PXG1, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9, PXG11) 属于 γ -变形菌门 Gamma-proteobacteria,其中 PXG5, PXG8, PXG11 属于肠杆菌属 *Enterobacter*, PXG1, PXG9, PXG6 属于沙雷氏菌属 *Serratia*, PXG4 属于寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*, PXG2 属于香味菌属 *Myroides*。

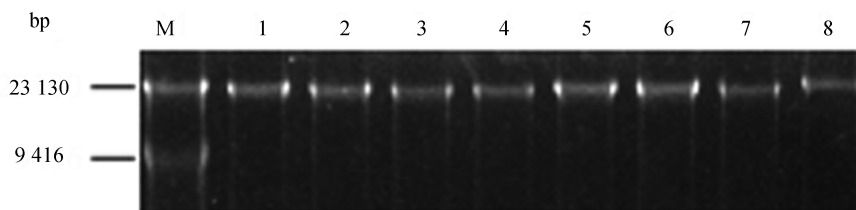


图2 小菜蛾3龄幼虫中肠细菌基因组 DNA 的提取

Fig.2 Genomic DNA isolated from the bacteria of the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella*

M: λ HindIII DNA 分子量标准物 λ HindIII DNA ladder marker; 1-8: 分别分离自 PXG1, PXG2, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9 和 PXG11 的菌株基因组 DNA genomic DNA isolated from PXG1, PXG2, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9 and PXG11, respectively.

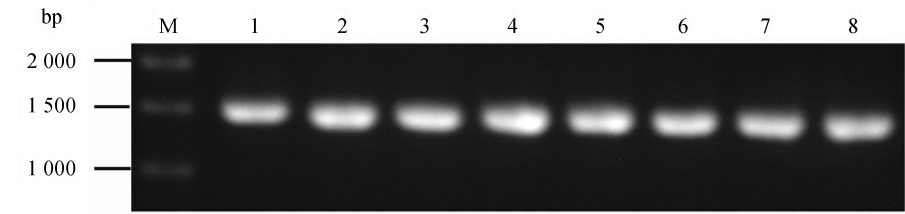


图3 小菜蛾中肠细菌 16S rDNA PCR 产物

Fig. 3 Electrophoresis of the 16S rDNA PCR products of the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella* M:DNA 分子量标准物(500 – 12 000) wide range DNA marker (500 – 12 000); 1 – 8: 菌株 PXG1, PXG2, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9 和 PXG11 的 16S rDNA 16S rDNA amplification from PXG1, PXG2, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9 and PXG11, respectively.

表1 小菜蛾3龄幼虫中肠细菌 16S rDNA 序列的 blast 比对结果
Table 1 Blast-based alignment of 16S rDNA from the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella* with the GenBank database

菌株编号 Clone No.	GenBank 登录号 GenBank accession number	Blast 结果中一致性最高的菌株 (GenBank 登录号) (%) Blast sequences with highest identity (GenBank accession number) (%)	同源菌株的来源 The origin of homologue strain
PXG1	(JQ396385)	<i>Serratia</i> sp. PT2 (GU458282) (99)	蚂蚁肠道 Termite gut
PXG2	(JQ396386)	<i>Myroides odoratimimus</i> strain 1CK58 (JQ229805) (99)	水稻内生细菌 Endophytic bacteria in rice
PXG4	(JQ396387)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SeNA4 (HM352411) (99)	甜菜夜蛾幼虫肠道 Gut of <i>Spodoptera exigua</i> larvae
PXG5	(JQ396388)	<i>Enterobacter</i> sp. KK1 (GQ871449) (99)	污水 Sewage
PXG6	(JQ396393)	<i>Serratia</i> sp. bk_46 (HQ538684) (100)	活性污泥 Bulking activated sludge
PXG8	(JQ396389)	<i>Cedecea davisae</i> isolate PSB5 (HQ242718) (99)	富磷土壤 Phosphate rich soil
PXG9	(JQ396390)	<i>Serratia</i> sp. HUB-107 (FJ862037) (100)	美国扁柏韧皮部 <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> phloem
PXG11	(JQ396391)	Uncultured bacterium clone 16slp101-1fl10. q1k (<i>Enterobacter</i> sp.) (GQ157218) (99)	人肠道粘膜 Mucosal biopsy from human intestinal

2.3 系统发育分析

将测序得到的小菜蛾3龄幼虫中肠细菌16S rDNA序列进行系统进化分析(图4),进化树进一步支持了RDP Classifier分类结果, *Serratia*、

Enterobacter、*Stenotrophomonas* sp. 以及 *Myroides* 分别在进化树上形成独立分枝,且 *Serratia*、*Enterobacter* 和 *Stenotrophomonas* sp. 形成了一个以γ-变形菌门(Gamma-proteobacteria)为家族的大分

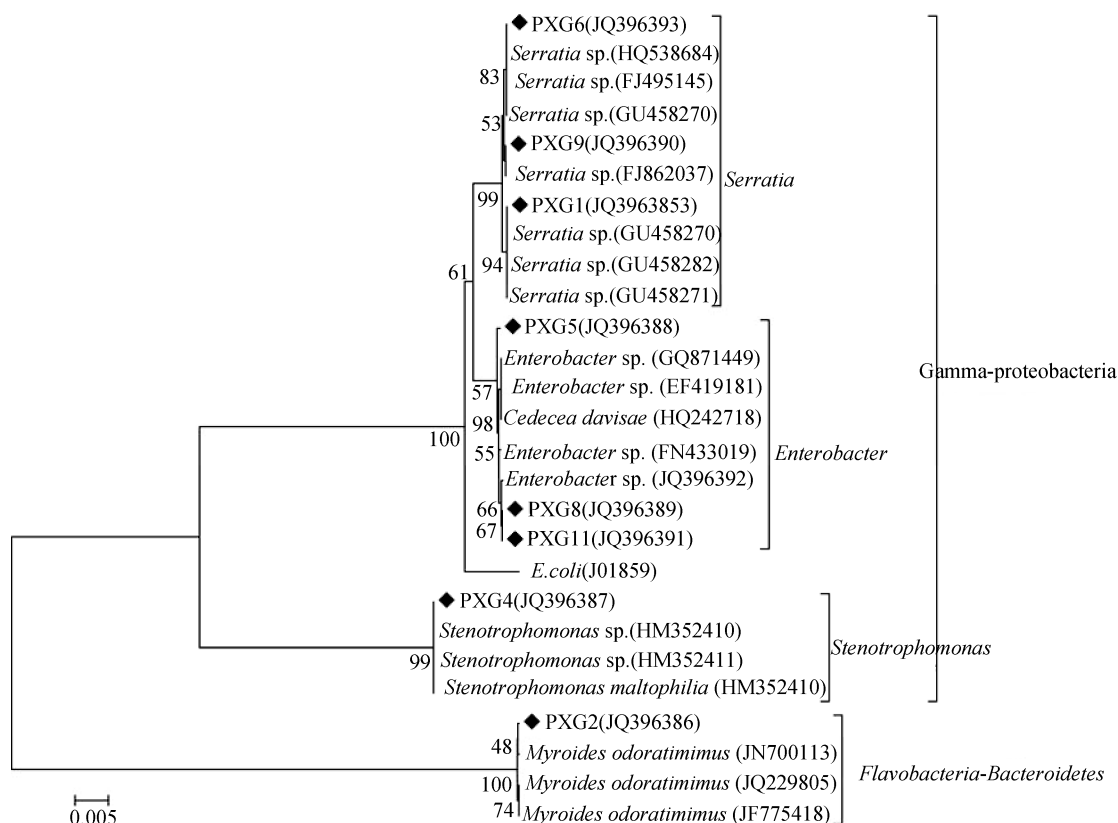


图4 小菜蛾3龄幼虫中肠细菌16S rDNA系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences from the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella*

菱形标记的序列分离自小菜蛾3龄幼虫中肠,所有序列比对过程中产生的空隙都被去除,分支间的数值是基于bootstrap验证的自展检验值(1 000次重复),刻度标尺表示0.5%的进化差异。

Sequences isolated from the 3rd instar larval midgut of *Plutella xylostella* are marked with a diamond symbol. All positions containing gaps and missing data are eliminated. The bootstrap test (1 000 replicates) is shown next to the branches. The scale bar represents 0.5% estimated phylogenetic divergence.

枝,表明 Gamma-proteobacteria 为小菜蛾3龄幼虫肠道可培养细菌中的优势类群。

3 讨论

伴随着测序技术的飞速发展,微生物学研究,特别是环境群体微生物学的研究取得了长足进步,但是传统的微生物分离纯培养技术依然是微生物学研究中最重要工具之一。只有通过微生物的分离纯化才能获得纯的菌株材料,以便鉴定其种属组成并进一步验证其功能,为后续的理论研究和应用奠定基础。本文借助传统的微生物分离纯培养技术从小菜蛾3龄幼虫中肠分离到了8株细菌,分属于 *Serratia*、*Enterobacter*、*Stenotrophomonas* 以及 *Myroides* 4个属,其中7株菌(PXG1, PXG4, PXG5, PXG6, PXG8, PXG9, PXG11)

均归类于 γ -变形菌门 Gamma-proteobacteria,表明 Gamma-proteobacteria 在小菜蛾3龄幼虫中肠可培养细菌中占据了统治地位,同时也提示该门细菌可能对小菜蛾的生长发育、食物消化等方面发挥着重要的作用。在很多鳞翅目昆虫,如家蚕(相辉等,2007)、棉铃虫(Xiang *et al.*, 2006)、舞毒蛾(Broderick *et al.*, 2004)的中肠优势菌群均为厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria),表明这两类细菌在鳞翅目昆虫中肠中广泛存在,并对宿主具有重要作用。本文并没有从小菜蛾中肠中分离到厚壁菌门(Firmicutes)细菌,可能是小菜蛾的中肠较直,结构比较简单,这种肠道结构比较均质,里面的微环境变化较小,此外小菜蛾中肠属于高碱性环境,决定了小菜蛾中肠微生物多样性可能比较低(相辉和黄勇平,2008),也可能是

受到培养基以及分离条件的限制,后续研究中可以通过增加培养基的种类,优化培养基以及培养条件,从而分离出更多的细菌种属。

昆虫肠道微生物通过与宿主的互惠共生,相互依存,促进和提高了昆虫的生命活动。肠道微生物在与其宿主长期的协同进化过程中,形成了共同的进化机制(相辉和黄勇平,2008)。本文从小菜蛾中肠分离到8株细菌,优势菌群为变形菌门(Proteobacteria),主要由 *Serratia* 和 *Enterobacter* 两个属组成。*Enterobacter* 能够参与碳的代谢,其大量存在可能与食物消化吸收有关,而作为条件性致病菌 *Serratia*(被认为是致病菌),大量存在于小菜蛾中肠中,而且在其它一些昆虫(如舞毒蛾和蚊子)肠道中也发现了 *Serratia*(Broderick *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011),表明该类细菌可能是在与昆虫的共进化过程中被保存下来,并对昆虫的生命活动发挥着作用。此外,本文中分离到的3株细菌(PXG1, PXG6, PXG9)均能在以毒死蜱为唯一碳源的无机盐培养基上生长,表明这3株菌具备降解毒死蜱的能力。这3株菌均属于沙雷氏菌属 *Serratia*,该属细菌具备毒死蜱降解能力是否与小菜蛾的农药抗性相关还需要进一步验证,但同时也提示昆虫肠道微生物可能参与农药的代谢降解,而且昆虫肠道可以作为分离筛选农药降解菌的环境资源。本研究中还分离到了另外两株菌 PXG2 香味类香味菌 *Myroides odoratimimus* 和 PXG4 寡养食单胞菌 *Stenotrophomonas* sp.。香味类香味菌 *Myroides odoratimimus* sp. 是一种革兰氏阴性需氧细菌,能够降解多种多糖,其所含的氨基酸、脂肪酸以及维生素 B3 能够促进家蝇幼虫的生长发育(苏志坚,2009)。寡养食单胞菌 *Stenotrophomonas* sp. 是一种革兰氏阴性细菌,具备降解角蛋白的能力(王晶等,2007),估计对于小菜蛾的食物消化和生长发育发挥着作用。

基于中肠微生物对宿主昆虫的重要作用,其研究日益受到关注。由于受到细菌分离培养的限制,单纯利用传统微生物纯培养方法不能很好的阐述肠道细菌的群落结构,高通量测序虽然能够很好的解决这个问题,但肠道菌的功能验证依然要基于细菌分离培养的基础上。因此,在近年来高通量测序技术广泛应用于肠道微生物研究的同时,结合传统的微生物分离操作技术,有助于提高中肠微生物的研究效率和水平。本文通过传统的

微生物分离纯培养技术从小菜蛾3龄幼虫肠道中分离细菌,并分析其肠道菌群结构组成,为后续的生物学功能验证提供了理论支持和菌体材料。

致谢:本研究在农业部亚热带农业生物灾害与治理重点开放实验室、福建省昆虫生态重点开放实验室和福建省高等学校农业生物多样性与生态安全重点实验室完成。感谢福建农林大学应用生态研究所的白建林在小菜蛾幼虫中肠解剖实验中的帮助及姚凤奎和胡桂萍在论文撰写上的帮忙和建议。

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.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J, 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*, 103(41):15196–15199.
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*, 8(12):1291–1298.
- Lee DW, Choi JY, Kim WT, Je YH, Song JT, Chung BK, Boo KS, Koh YH, 2007. Mutations of acetylcholinesterase1 contribute to prothiofos-resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353(3):591–597.
- Reddy GVP, Guerrero A, 2000. Pheromone-based integrated pest management to control the diamondback moth *Plutella xylostella* in cabbage fields. *Pest Manag. Sci.*, 56(10):882–888.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4):406–425.
- Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Ilana ZR, Rosenberga E, 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 107(46):20051–20056.
- Shelton AM, Nault BA, 2004. Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.*, 23(6):497–503.
- Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev.*

- Entomol.* , 38(1):275 – 301.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* , 28(10):2731 – 2739.
- Wakisaka S, Tsukuda R, Nakasuji F, 1991. Life tables of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) and effects of rainfall, temperature and host plants on survival and reproduction. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* , 35(2):115 – 122.
- Wang Y, Gilbreath TM, Kukutla P, Yan G, Xu J, 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the Malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS ONE* , 6(9): e24767.
- Xiang H, Wei GF, Jia S, Huang J, Miao XX, Zhou Z, Zhao LP, Huang YP, 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol.* , 52(11): 1085 – 1092.
- 江丽辉, 王栋, 刘树生, 2001. 寄主植物对小菜蛾产卵选择性及菜蛾绒茧蜂寄主选择行为的影响. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 27(3):273 – 276.
- 苏志坚 (2009). 细菌对家蝇幼虫生长发育的影响及其在肠道定殖的研究. 博士学位论文. 广州: 中山大学.
- 王晶, 陈丽, 曹张军, 周美华, 2007. 一株羽毛角蛋白降解菌的分离与鉴定. 农业环境科学学报, 26:105 – 109.
- 相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物和昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5):687 – 693.
- 相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平, 2007. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. 昆虫学报, 50(3):222 – 233.
- 杨峰山, 吴青君, 徐宝云, 曹丽波, 朱国仁, 张友军, 2006. 小菜蛾对 Bt 毒素 Cry1Ac 和 Bt 制剂抗性的选育及其抗性种群的生物学适应性. 昆虫学报, 49(1):64 – 69.

向日葵螟成虫种群消长动态和空间分布型*

白全江^{1**} 云晓鹏¹ 徐利敏¹ 黄俊霞² 杜磊¹ 曹丽霞¹

(1. 内蒙古农牧业科学院植物保护研究所 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古自治区植保植检站 呼和浩特 010000)

摘 要 为了科学指导应用播期避害、性诱剂诱捕成虫和田间释放天敌昆虫-赤眼蜂防治向日葵螟, 确定最佳防治时期和选择最佳防治方法, 2009—2011 年, 在内蒙古巴彦淖尔市利用向日葵螟 *Homoeosoma nebulellum* (Denis et Schiffmüller) 性诱剂进行了向日葵螟田间种群动态和空间分布型的研究。结果表明, 向日葵螟成虫每年 5 月中旬始见, 直到 9 月底, 一年有两个明显的成虫蛾峰期, 第 1 个蛾峰期出现在 6 月下旬至 7 月上旬, 第 2 个蛾峰期在 7 月下旬至 8 月中旬, 当地向日葵 1 年受到两代幼虫的危害, 而且开花期与向日葵螟两个蛾峰期吻合度越高, 向日葵受螟幼虫的危害越重; 通过应用 5 种聚集度指数测定和 Blackith 种群聚集均数 λ 分析, 向日葵螟成虫在田间呈聚集分布, 聚集主要由向日葵螟自身行为及环境因素引起。根据成虫动态和空间分布型, 可以科学指导应用播期避害、性诱剂诱捕器和释放天敌昆虫的最佳时期及方式。

关键词 向日葵螟, 种群动态, 空间分布, 内蒙古

Population dynamics and spatial distribution pattern of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*

BAI Quan-Jiang^{1**} YUN Xiao-Peng¹ XU Li-Min¹ HUANG Jun-Xia² DU Lei¹ CAO Li-Xia¹

(1. Plant Protection Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China; 2. Inner Mongolia Plant Protection Station, Hohhot 010000, China)

Abstract We studied the population dynamics and spatial distribution of adult *Homoeosoma nebulella* (Denis et Schiffmüller) using pheromone traps in Bayannur, Inner Mongolia from 2009 to 2011. The purpose of the study was to determine the timing of control and the choice of optimal control methods for this species, and to provide a scientific basis for control methods such as adjusting planting date, pheromone trapping and the use of *Trichogramma* wasps in the field. We found that *H. nebulella* adults emerged from mid-July until late September. There were two distinct flight peaks in a year, the first between late June and early July and the second between late July and mid-August. Cultivated sunflowers were damaged by the larvae of two generations, and the degree of damage was closely related to the goodness of fit between flowering period and the moth flight peak. From testing five indices of aggregation and analyzing the value of λ , the distribution of adult sunflower moths in the field showed an aggregated pattern, which resulted mainly from a combination of this moth's biological characteristics and environmental factors. From this, we can make better informed decisions on when to adjust planting dates, use pheromone traps and release *Trichogramma* in the field.

Key words *Homoeosoma nebulellum*, population dynamics, spatial distribution pattern, Inner Mongolia

向日葵螟 *Homoeosoma nebulellum* (Denis et Schiffmüller) 又称葵螟, 是一种隶属于鳞翅目螟蛾科的害虫, 其幼虫食性相对单一, 在作物中仅危害向日葵和茼蒿。成虫产卵于筒状花, 初孵幼虫取食筒状花和花粉, 幼虫从 3 龄开始蛀食籽仁, 严

重影响葵花籽的产量和品质。国内主要分布于黑龙江(叶家栋和朱秀廷, 1965)、吉林(李桓, 1981)、新疆(李安金, 1983)以及内蒙古(徐利敏等, 2008)等地。国内叶家栋和朱秀廷(1965)及李桓(1981)最早对向日葵螟发生危害进行了调查报道, 向日

* 资助项目: “国家现代农业产业技术体系建设项目-向日葵产业技术研发中心”(nyctx-21-b01)。

**E-mail: qj_bai@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-08-03, 接受日期: 2013-03-06

葵螟在黑龙江一年发生 1~2 代,新疆一年发生 2~3 代。2006—2007 年向日葵螟在内蒙古巴彦淖尔市大暴发,发生危害面积占播种面积的 70% 以上,产量损失 30% 左右(张总泽等,2010a)。通过对当地向日葵螟生活史和种群动态研究,初步明确了向日葵螟在巴彦淖尔地区一年发生 2 个世代(张总泽等,2010b)。

在我国,对昆虫空间分布型的研究已经覆盖了多种重要的农林害虫,对于鳞翅目昆虫而言,由于幼虫是为害的主要虫态和防治对象,因此绝大部分对鳞翅目昆虫空间分布型的研究集中于对成虫以前各个虫态(兰星平,1992;宗世祥等,2004;沈斌斌,2005;张志春,2006)。张总泽等(2010c)曾应用 6 种聚集指标测定向日葵螟幼虫的空间分布型,确定其幼虫在田间呈聚集分布。然而对向日葵螟而言,由于幼虫藏身于葵花籽粒内危害,化学农药难以接触虫体发挥药效,同时对传粉昆虫危害较大,所以目前防治措施主要包括调整播期避害,应用性诱剂诱捕器和频振式杀虫灯诱杀成虫以及应用天敌昆虫-赤眼蜂等绿色防治技术,达到防控向日葵螟的目的。上述防治措施主要针对向日葵螟的成虫期和卵期发挥作用,因此,成虫的时间动态及空间分布特征在防治中变得更为重要。本研究通过对向日葵螟成虫进行多年、多点观测,明确了向日葵螟成虫在巴彦淖尔市不同旗县(区)田间不同生态环境条件下动态情况,同时,在国内首次对向日葵螟成虫在田间的空间分布型进行了研究,为向日葵螟预测预报和制定播期避害、放置性诱剂诱捕器和释放天敌昆虫-赤眼蜂选择最佳时期,提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 种群田间消长动态调查

研究于 2009—2011 年在巴彦淖尔市临河区、杭锦后旗、五原县和乌拉特前旗进行,每年 5 月初开始在各旗县(区)分别安放向日葵螟性诱剂诱捕器 4~6 个,各诱捕器间距在 100 m 以上。诱捕器为水盆式诱捕器,水盆直径 35 cm,深 15 cm,固定在高 150 cm 左右的木制三脚架上,盆内盛有 0.2% 的洗衣粉水溶液,诱芯由北京中捷四方公司生产,内含 0.5 mg 的向日葵螟性诱剂,诱芯以细铁丝固于盆中央水面上方 1.5 cm 左右。调查时,每天清晨检查并记录各诱捕器内的葵螟数量,清

理水盆中的虫体,根据水面高度补充洗衣粉溶液并保持盆内清洁,诱芯 30 d 更换 1 次。对 4 个旗县(区)各诱捕器 4 d 诱蛾累积平均值进行统计,绘制成虫动态图。

另外,2009 年 5 月中旬—8 月下旬在五原县分别选择向日葵、苘蒿和杂草地安放诱捕器,3 块地间隔距离 200 m 左右,每种环境下放置 2 个诱捕器,观测不同生境条件下向日葵螟雄蛾种群动态,并绘制成虫动态图。依据 2009 年临河区向日葵螟成虫动态,结合播期试验,在收获期调查葵盘和籽粒受害率,明确向日葵螟蛾峰期与向日葵开花期吻合度对向日葵危害情况的影响。

1.2 成虫空间分布型

2009 年 7 月 12 日—8 月 30 日向日葵螟成虫发生期,在巴彦淖尔市杭锦后旗、临河区选择连片种植感虫的当地常规品种向日葵地 8 块,每块 8 000 m²左右,共计 6.4 hm²。每块样地按照“4 × 5”棋盘式放置 20 个诱捕器,各诱捕器间隔 20 m。隔日调查各诱捕器诱蛾量,最终统计各诱捕器诱蛾总数,利用指数法判断昆虫种群空间分布型(张孝羲和张跃进,2006)。

1.3 统计分析方法

1.3.1 空间分布型测定 统计 3 块样地中各诱捕器的总诱捕量以及每次调查时的平均诱蛾数,根据平均诱捕量计算扩散系数 C 、Moore I 指标、 Ca 指标、Lloyd m^*/m 指标、负二项分布参数 K 5 种聚集度指标,聚集度指标的计算公式以及判定标准参见张孝羲和张跃进(2006)、潘杰等(2010)的方法。

1.3.2 回归方程检验 将 3 块样地诱捕器调查结果,以每次检查结果为一组,计算种群的平均数 m 、方差 V 以及平均拥挤度 m^* ,之后采用 Iwao (1968) 的 m^*-m 回归分析法以及 Taylor 幂法则等回归分析方法对空间分布型进行判定,回归分析的计算公式参见张孝羲和张跃进(2006)、兰兴平(1997)等的方法。

1.3.3 聚集原因分析 应用 Blackith 种群聚集均数 λ 检验分析聚集的原因,公式为 $\lambda = m\gamma/2k$,式中 k 为负二项分布参数; γ 是当自由度为 $2k$ 、 $\alpha = 0.5$ 时的 χ^2 分布的函数值,当 $2k$ 自由度为非整数时,利用等比例内插法计算 χ^2 的精确值。当 $\lambda < 2$ 时,聚集原因是由于某种环境因素所致;当 $\lambda \geq 2$

时,其聚集原因可能是由于生物本身的聚集行为或由于生物本身的聚集行为与环境的异质性共同作用引起。

2 结果与分析

2.1 田间种群消长动态

2009—2011 年向日葵螟雄蛾田间消长趋势如图 1。由图 1 可见,3 年总体动态基本一致,始发期均在 5 月中旬,一直持续到 9 月底,期间有两个

明显蛾峰,越冬代雄蛾峰期在 6 月下旬—7 月上旬,高峰期在 7 月初,一代成虫雄蛾峰期在 8 月中下旬,高峰期略有差异。2009 年和 2010 年越冬代成虫蛾峰值明显高于一代蛾峰值,而且蛾峰期较长;2011 年一代蛾峰值显著高于前两年,分别是 2009 年和 2010 年一代诱蛾量的 1.8 倍和 4.4 倍,而且还高于当年越冬代成虫高峰值。2010 年和 2011 年一代成虫蛾峰期与 2009 年相比有所推迟,蛾高峰分别在 8 月 28 日和 8 月 20 日。

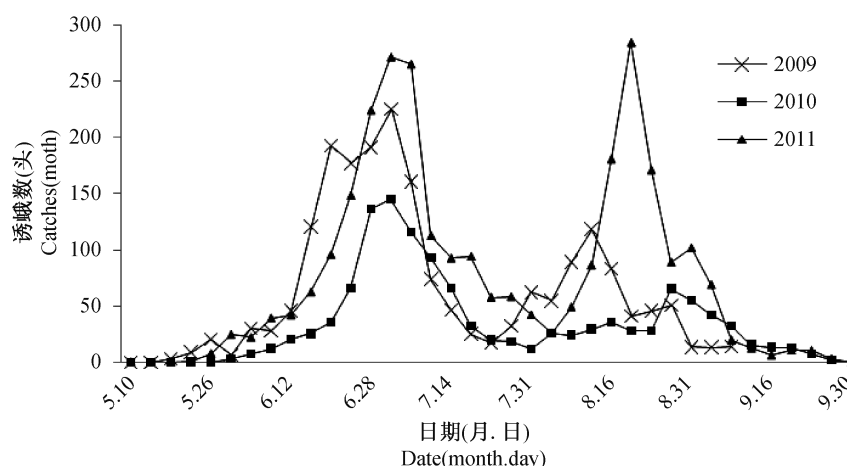


图 1 巴彦淖尔市向日葵螟成虫动态 (2009—2011)

Fig. 1 Adult population dynamics of *Homoeosoma nebulella*, Bayannur, 2009 – 2011

2009 年临河区向日葵螟成虫始见于 5 月中旬,到 8 月底前有两次明显蛾峰,由于向日葵螟低龄幼虫在向日葵种子成熟之后即无法蛀入并进一步危害,因此同一片向日葵田每年只会出现一次幼虫危害高峰,本项研究结合了当年向日葵 4 月 30 日至 6 月 14 日 10 个不同播期试验来推测当地幼虫的实际发生世代数。结果表明,各处理播期向日葵开花期集中在 7 月 6 日—8 月 11 日,在此期间开花越早的向日葵,葵盘和籽粒受越冬代成虫即一代幼虫危害越重,其中 5 月 25 日播种,即 7 月 26 日左右开花的向日葵,葵盘和籽粒受害最轻,葵盘受害率仅为 26%,籽粒受害率为 0.3%。但随着花期的进一步推迟,向日葵葵盘受一代成虫即 2 代幼虫的危害再次逐渐加重,其中 6 月 14 日最晚播期,即 8 月 11 日开花的向日葵,葵盘受害率最高,达到 80%,籽粒受害率也较前几个播期相对较重。说明蛾峰期与花期的吻合度越高,向日葵受害越重,同时说明内蒙古自治区西部全年

受到两代向日葵螟幼虫的危害(图 2)。

在不同生态环境条件下种群动态结果见图 3,从 5 月中旬—8 月下旬,向日葵、苘蒿和草滩 3 种不同生态环境下,向日葵螟发生时间和蛾峰期基本相同,在 6 月下旬和 8 月上旬有两个明显的蛾峰,而且在 3 种不同环境条件下诱蛾量和蛾峰大致相同,仅仅是第 2 次蛾峰出现时间略有一些差异,蛾峰出现时间依次为苘蒿地、杂草地和向日葵地,其中苘蒿地蛾峰提前 7 d 左右,杂草地较向日葵地提前 4 d 左右。而且,诱蛾量也较向日葵田相对高,向日葵田诱蛾量仅为苘蒿和杂草地的 60%~70%。其原因可能与向日葵花期已过,而苘蒿属无限花序,花期较长,杂草因种类较多,花期较长,对向日葵螟有诱集作用。

2.2 向日葵螟的空间分布型

2.2.1 聚集度指数测定 通过分析向日葵螟成虫聚集度指数 5 种计算方法测定结果(表 1)可以看出,在 3 片样地中, $C > 1$, $I > 0$, $Ca > 0$, $m^*/$