抗溴虫氟苯双酰胺斜纹夜蛾肠道微生物多样性研究*

陈炜杰[1**] 李振宇[2] 胡琼波[1***] 尹 飞[2***]

（1. 华南农业大学植物保护学院，绿色农药全国重点实验室，广州 510520；
2. 广东省农业科学院植物保护研究所，广东省植物保护新技术重点实验室，广州 510640）

摘 要 【目的】肠道微生物在害虫抗性发展中发挥着重要作用，斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是全球范围内的广食性害虫，其抗性问题已成为世界性难题。本研究旨在探究对溴虫氟苯双酰胺敏感和抗性斜纹夜蛾种群的肠道微生物的多样性差异，分析肠道微生物与宿主抗药性的关系。【方法】选取中等抗性水平与敏感水平的斜纹夜蛾提肠道微生物 DNA 样本，利用高通量测序技术进行 16S V3-V4 区域的扩增子测序，基于 97%相似度优化 OTUs（Operational taxonomic units），开展物种丰度、肠道微生物组成结构、α 多样性和 β 多样性分析等。【结果】微生物组测序共获得 1 208 279 条序列，经优化聚类为 529 个 OTUs，共 22 个门 44 个纲 84 个目 138 个科 207 个属。从属水平上看，敏感种群有 62 个特有菌属，抗性种群有 50 个特有菌属，两品系共同拥有菌属 95 个。在肠道菌群组成方面两品系有显著差异（P<0.05），抗性种群主要以丹毒丝菌属 *Erysipelatoclostridium* 为主，敏感种群以肠球菌属 *Enterococcus* 为主，相对丰度分别为 57.24%和 47.71%。多样性分析表明，抗性种群斜纹夜蛾的肠道微生物群落物种丰度最多，敏感种群斜纹夜蛾的物种丰富度和均匀度则要更高。【结论】田间大量施药影响斜纹夜蛾肠道菌群，使得肠道菌群复杂多样。两品系的微生物群落构成明显不同，抗性种群斜纹夜蛾的菌群组成更为复杂，敏感种群斜纹夜蛾的菌群组成更稳定。本研究为开发新型农药提供了新思路，并为进一步揭示斜纹夜蛾抗性机理奠定了基础。

关键词 斜纹夜蛾；肠道微生物；多样性分析；抗性

The diversity of gut microbiota diversity in broflanilide-resistant *Spodoptera litura*

CHEN Wei-Jie[1**] LI Zhen-Yu[2] HU Qiong-Bo[1***] YIN Fei[2***]

(1. College of Plant Protection, South China Agricultural University, National Key Laboratory of Green Pesticides, Guangzhou 510520, China; 2. Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract **[Aim]** Gut microbes play an important role in the development of pest resistance. *Spodoptera litura* is a widespread polyphagous pest species that is becoming increasingly resistant to pesticides. To determine the relationship between gut microbes and host resistance, we compared gut microbial diversity between bromoflumizamide-susceptible and bromoflumizamide-resistant populations of *S. litura*. **[Methods]** DNA samples of gut microorganisms were taken from *S. litura* with intermediate levels of bromoflumizamide resistance and susceptibility. Amplicon sequencing of the 16S V3-V4 region was carried out using high-throughput sequencing technology to optimize the OTUs based on 97% similarity and determine microbe species abundance, gut microorganism composition and structure, α diversity, and β diversity. **[Results]** Total microbiome sequencing yielded 1 208 279 sequences which were optimally clustered into 529 OTUs containing 22 phyla, 44

*资助项目 Supported projects：广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目（2024CXTD21）；广州市科技计划项目（2025D04J0056）

**第一作者 First author，E-mail：vicichan@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：hqbscau@scau.edu.cn；feier0808@163.com

收稿日期 Received：2023-06-27；接受日期 Accepted：2023-08-19

classes, 84 orders, 138 families, and 207 genera. At the genus level, there were 62 endemic genera in the bromoflumizamide-susceptible population and 50 endemic genera in the bromoflumizamide-resistant population. The two populations shared 95 genera. There were significant differences in the composition of the intestinal flora between the two strains (P<0.05). *Erysipelatoclostridium* dominated the microbiome of the bromoflumizamide-resistant population, whereas *Enterococcus* was the dominant microbiome in the bromoflumizamide-susceptible population, with relative abundances of 57.24% and 47.71%, respectively. Diversity analysis showed that the intestinal microbial community of the bromoflumizamide-resistant population of *S. litura* had the highest species abundance. In contrast, the bromoflumizamide-susceptible *S. litura* population had a higher species richness and consistency. **[Conclusion]** There was a significant difference in the microbial community composition between the bromoflumizamide-susceptible and bromoflumizamide-resistant populations. The bromoflumizamide-resistent population of *S. litura* exhibited a more complex gut microbome composition, while the bromoflumizamide-susceptible *S. litura* population exhibited a more stable flora composition. In this paper, we explored the relationship between insect resistance and gut microorganism diversity. Our findings provide a new perspective for the development of novel pesticides and lay a foundation for further research into the mechanisms of resistance in *S. litura*.

Key words　*Spodoptera litura*; gut microbiota; diversity analysis; resistance

昆虫是自然界中分布最为广泛、数量最多的节肢动物类群之一，对全球的生态系统有着重要影响（Basset e*t al*., 2012）。昆虫的种类繁多与其体内丰富多样化的肠道微生物密不可分，昆虫肠道内存在着大量微生物，这些肠道微生物与其寄主存在着复杂密切的关系，相互影响与相互作用，形成一种协同进化的关系（相辉和黄勇平, 2008; Banerjee *et al*., 2022; 陆秋成等, 2023）。研究表明，昆虫的肠道为肠道微生物提供了适宜的生存环境，反之肠道微生物也影响宿主昆虫的食物消化、生长发育和繁殖（鲁迎新等, 2016）。此外，肠道微生物能够提高昆虫的抵抗能力，帮助昆虫降解自然有毒物质，通过矿化过程和代谢过程，把有机物转化为无机物，使得昆虫体内的有毒物质转化为无毒物质（Kikuchi *et al*., 2012; De Fine Licht *et al*., 2013; Sato *et al*., 2021）。近年来，肠道微生物的多样性和生物学特性在害虫综合防治中的重要作用已被频繁报道，但新型双酰胺类杀虫剂溴虫氟苯双酰胺对害虫肠道微生物的影响尚无研究报道。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是世界性分布的广食性害虫，具有很强的迁飞能力，对棉花、玉米、大豆和花生等栽培作物造成严重危害（Tuan *et al*., 2016）。由于斜纹夜蛾的高繁殖率，田间不得不依赖大量的化学农药进行防治，长期不合理大量使用化学农药，已经使得斜纹夜蛾对多种杀虫剂产生了高抗药性，包括拟除虫菊酯、溴氰菊酯、氨基甲酸酯及阿维菌素等，且其抗性谱不断扩大，斜纹夜蛾的抗药性治理成为世界性难题（桑松等, 2013; Tuan *et al*., 2014; Sang *et al*., 2016; Xiao and Lu, 2022）。

溴虫氟苯双酰胺自 2019 年上市，是一类双酰胺杀虫剂，因其作用高效、广谱，无交互抗性，逐步占据市场份额并成为防治鳞翅目害虫如斜纹夜蛾的重要农药（顾林玲和柏亚罗, 2020; 柏亚罗, 2022），但溴虫氟苯双酰胺的大量使用必然引起害虫抗药性的产生，开展斜纹夜蛾对溴虫氟苯双酰胺抗性的研究，有助于延缓斜纹夜蛾对该药剂抗药性的发展进程，对指导害虫综合防控技术及阐明害虫对双酰胺类杀虫剂的抗药性机理有重要的指导意义。

本研究通过提取斜纹夜蛾肠道微生物 DNA，利用测序平台比较分析敏感和抗性种群斜纹夜蛾肠道微生物多样性、物种均匀度、丰富度及优势菌群差异等，解析了肠道微生物在斜纹夜蛾抗溴虫氟苯双酰胺中的作用，为开发新型农药提供了新思路，并为斜纹夜蛾抗药性治理及抗药性机理的阐明提供了依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

抗性种群于 2021 年 7 月在广东翁源芋头

Colocasia esculenta 叶片上采集后，置于室内饲养，幼虫用人工饲料饲养，成虫期喂 10%蜂蜜水。用溴虫氟苯双酰胺亚致死剂量筛选，以维持抗性水平，敏感种群为吉林农业大学室内培养提供。斜纹夜蛾饲养条件：温度（26±1）℃，相对湿度 75%±5%，光周期 16 L∶8 D。

1.2 斜纹夜蛾抗性种群的抗性水平测定

采用叶片药膜法开展斜纹夜蛾抗性种群的抗性水平测定。用新鲜甘蓝叶片，剪成直径 10 cm 的圆片。将叶片在药液中浸泡 15 s，取出晾干放置于培养皿中，每个培养皿放入 10 头 3 龄幼虫，置于培养箱（上海拓西电子科技有限公司 HN-36BS）饲养，温度（26±1）℃，相对湿度 65%-70%，光周期 16 L∶8 D。每处理重复 4 次，48 h 后检查死亡率。计算毒力回归方程、LC_{50} 值、置信区间及抗性倍数（抗性倍数=抗性 LC_{50}/敏感 LC_{50}，低抗性水平 1-10，中等抗性水平 10-100，高水平抗性>100〔张帅等, 2014〕）。虫体不能正常运动和触碰虫体没反应视为死亡。

1.3 肠道组织样品的制备

从抗性种群和敏感种群中各挑选 50 头生长发育程度一致健康的 3 龄幼虫，提前饥饿处理 24 h 以排除肠道内食物残渣的影响，解剖操作均在无菌操作台中进行。先把幼虫放入 75%酒精溶液中浸泡 3 min，无菌水进行冲洗，去除虫体表面的酒精，再放入配置好的 PBS 缓冲液中进行解剖。使用尖头镊子分别夹住幼虫的头部和尾部，再轻轻拉拽和撕扯表皮，取出完整的肠道组织，去除多余的马氏管、前肠和后肠，解剖过程中的肠道组织用液氮保存。10 头 3 龄幼虫作为一个重复，重复 5 次。最后取出的中肠组织放在 2 mL 离心管中，用研磨机进行研磨，研磨结束后放置在 - 80 ℃冰箱保存。

1.4 肠道微生物基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

将提前处理的肠道样本，按照 DNA 提取试剂盒（DNA Kit DP304，天根生化科技（北京）有限公司）方法提取样本总 DNA，提取好的 DNA 进行 PCR 扩增，用带有 Barcode 的特异引物扩增 16S rDNA 的 V3-V4 区。引物序列为：341F (5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′)；806R (5′-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3′)。PCR 反应体系：10×PCR Buffer 2.5 μL、DNA 模板 1 μL、dNTPs 2 μL、Fast Pfu Polymerase 0.3 μL、上下游引物各 0.5 μL、ddH_2O 18.2 μL 。PCR 反应程序：95 ℃预变形 3 min，94 ℃变性 30 s，53 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，重复 30 个循环，72 ℃终延伸 10 min。最后将 PCR 扩增产物进行凝胶（1.5%）电泳检测。

1.5 文库构建和上机测试

使用建库试剂盒（Illumina DNA Prep Kit（Illumina, CA, USA））进行文库的构建，构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测，合格后进行上机测序。测序完成后，得到的原始数据存在一定的干扰数据，为了使信息分析的结果更加准确可靠，先对低质量 Reads 进行过滤，然后将双端 Reads 拼接为 Tag，再对 Tag 进行低质量过滤，使用 Usearch 软件进行聚类，去除聚类过程中检测到的嵌合体 Tag，获得 OTU 的丰度和 OTU 代表序列。得到有效数据，随后对得到的有效数据进行物种注释以及丰度分析，从而揭示样本的物种构成；最后通过 α 多样性、β 多样性分析、物种差异性分析和环境因子相关性分析，挖掘样本间群落结构的差异。

2 结果与分析

2.1 不同种群斜纹夜蛾对溴虫氟苯双酰胺的抗性

室内生物活性测定结果如表 1 所示，翁源种群即抗性种群的 LC_{50} 为 1.257 mg/L，敏感种群的 LC_{50} 为 0.083 mg/L。翁源种群的抗性倍数为 15.14，处于中等抗性水平。

2.2 斜纹夜蛾抗性、敏感种群肠道微生物高通量测序结果

通过测序平台对不同品系的斜纹夜蛾肠道微生物 16S rDNA 的 V3-V4 区域进行测序，结果表明两品系肠道菌群测序所得的条带数有所

差异（表 2）。两个品系共 10 个样品，一共取得 1 208 279 条序列，经过拼接和过滤，优化得到有效序列数为 1 207 417，有效序列占比为 99.93%。将优化得到的有效序列进行 97% 的相似度的运算分类单元聚类分析，经优化并物种注释，获得共 529 个 OTUs（Operational taxonomic unit），可以将其分类为 22 个门，44 个纲，84 个目，138 个科，207 个属。其中敏感种群有 311 个 OTUs，抗性种群有 347 个 OTUs，两品系相同的 OTUs 共 129 个。从图 1 可以看出稀释曲线从原点上升到最后趋势平坦，Shannon 指数达到饱和说明本实验数据测序数量足够大，可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。

2.3　斜纹夜蛾抗性、敏感种群肠道微生物的 α 多样性分析

α 多样性分析结果如表 3 所示，抗性种群比敏感种群群落丰度物种多，Chao 值抗性种群的指数大于敏感种群，分别为 331.179 和 290.460；两个样本 Goods_coverage 指数均接近 1，说明样品中序列的检测率很高；敏感种群的 Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 2.588 和 0.680，抗性种群的 Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 2.157 和 0.619，敏感种群的指数均大于抗性种群，表明敏感种群的物种丰富度和均匀度最高，

表 1　不同种群斜纹夜蛾对溴虫氟苯双酰胺的抗性水平

Table 1　Resistance levels of different populations of *Spodoptera litura* to broflanilide

种群 Population	回归方程 Regression equation	LC_{50} (mg/L)	95%置信区间（mg/L） 95% Confidence interval (mg/L)	相关系数 R^2 Relevant coefficient	自由度 Degree of freedom	χ^2	抗性倍数 Resistance ratio
敏感种群 Susceptible population	Y=2.786+2.573X	0.083	0.047-0.120	0.98	2	2.014	1.00
抗性种群 Resistant population	Y= - 0.190+1.914X	1.257	0.864-2.025	0.95	4	6.710	15.14

表 2　斜纹夜蛾肠道微生物 16S rDNA 高通量测序基本信息

Table 2　Basic information of high-throughput sequencing of intestinal microbial 16S rDNA of *Spodoptera litura*

样品名称 Sample name	原始测序数据 Raw reads	高质量测序数据 Clean reads	分类单元 OTUs	有效率（%） Effective ratio (%)	不同分类类别的分类单元数量 Number of taxa of different taxonomic categories				
					门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
A-1	130 918	130 822	236	97.03	10	19	37	62	109
A-2	127 122	127 103	284	94.73	16	28	56	78	102
A-3	131 882	131 791	315	96.86	16	30	55	84	101
A-4	126 007	125 919	244	95.40	14	28	48	68	90
A-5	133 956	133 848	323	95.42	16	32	58	87	110
B-1	120 131	120 059	270	93.41	16	27	54	80	94
B-2	135 172	135 076	347	94.09	17	26	55	83	108
B-3	135 842	135 760	381	96.27	16	38	77	101	114
B-4	131 668	131 564	304	94.67	16	31	61	90	107
B-5	135 581	135 475	300	94.79	15	31	48	78	97

A 为敏感品系，B 为抗性品系。序号代表样品编号。下图和下表同。

OTUs: Operational taxonomic unit. A is the susceptible population, and B is the resistant population. The serial numbers represent the sample numbers. The same for the following tables and figures.

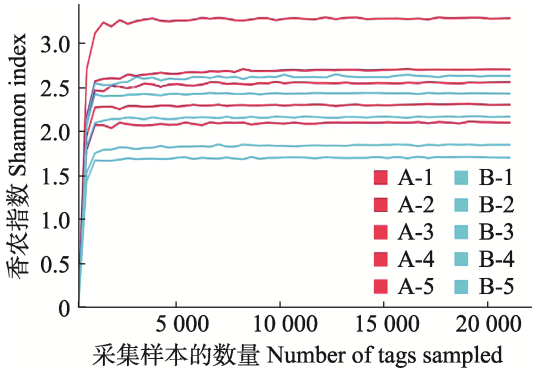


图 1 样品稀释曲线

Fig. 1 Sample rarafaction curve

优于抗性种群；敏感种群和抗性种群的 PD_whole_tree 指数分别为 49.324 和 55.382，敏感种群的指数要低于抗性种群。

2.4 斜纹夜蛾肠道微生物 β 多样性分析

为了探究敏感种群和抗性种群肠道微生物物种组成的多样性差异，比较肠道微生物组份间的结构，采用非度量多维尺度法（Non-metric Multidimensional Scaling，NMDS）对样本进行属水平聚类，结果显示两样本在三维度空间上距离远且无重合，同样本组间无重叠，表明组间差异显著，斜纹夜蛾敏感种群与抗性种群间的微生物群落存在明显差异（P<0.05）。统计检验结果显示，A 样品（敏感种群）的组内距离盒型图，最高点为 0.38，上四分位数（盒子顶边）为 0.36，下四分位数（盒子底边）为 0.15，最低点为 0.11，中位数为 0.20。B 样品（抗性种群）的组内距离盒型图，最高点为 0.32，上四分位数为 0.27，下四分位数为 0.16，最低点为 0.05，中位数为 0.20，组内样本间距离的均值存在显著差异（P<0.05）（图 2）。

2.5 斜纹夜蛾抗性、敏感种群肠道微生物的相对丰度差异分析

斜纹夜蛾肠道样本以门为分类单位上的微生物群落组成如图 3（A）所示。在以门水平分类中，抗性种群和敏感种群斜纹夜蛾肠道微生物组成相对丰度大于 0.1%共有 4 个门，分别为变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、蓝细菌门 Cyanobacteria 和拟杆菌门 Bacteroidetes。其中抗性种群斜纹夜蛾（B 样品）的优势菌门为厚壁菌门（94.52%），次优势菌门为变形菌门（4.97%）、蓝细菌门（0.27%）和拟杆菌门（0.24%）。敏感种群斜纹夜蛾（A 样品）的优势菌门为厚壁菌门（83.28%）和变形菌门（11.27%），次优势菌门为蓝细菌门（4.83%）和拟杆菌门（0.62%）。敏感种群和抗性种群斜纹夜蛾的肠道菌群门类水平组成上没有显著差异（P>0.05）。

从图 3（B）可知，以纲为水平分类单位时，斜纹夜蛾的抗性种群肠道微生物组成相对丰度大于 0.1%有芽孢杆菌纲 Bacilli、丹毒丝菌纲 Erysipelotrichia、α-变形菌纲 α-proteobacteria、γ-变形菌纲 γ-proteobacteria、产氧光细菌纲 Oxyphotobacteria、梭菌纲 Clostridia 和拟杆菌纲 Bacteroidia。其中敏感种群斜纹夜蛾的优势菌纲是芽孢杆菌纲（81.62%），次优势菌纲分别为 α-变形菌纲（6.55%）、产氧光细菌纲（4.82%）和 γ-变形菌纲（4.72%）。两种品系的优势菌纲以

表 3 不同品系斜纹夜蛾肠道微生物 α 多样性分析

Table 3 Alpha diversity of intestinal microbiota in different strains of *Spodoptera litura*

种群 Population	Chao 氏指数 Chao index	覆盖度 Goods_coverage	香农指数 Shannon iindex	辛普森指数 Simpson index	系统树发育距离 Phylogenetic diversity-tree distance
敏感种群 Susceptible population	290.460±36.29 a	0.999±0.000 76 a	2.588±0.45 a	0.680±0.05 a	49.324±8.95 a
抗性种群 Resistant population	331.179±36.55 a	1.000±0.000 11 a	2.157±0.38 a	0.619±0.08 a	55.382±6.63 a

表中数据为平均值±标准差（n=5），同列不同字母表示处理间差异显著（P<0.05，Welch T 检验）。

Values in the table are mean±SD (n=5). Different letters in the same column indicate significant difference between treatments (P<0.05, Welch T- test).

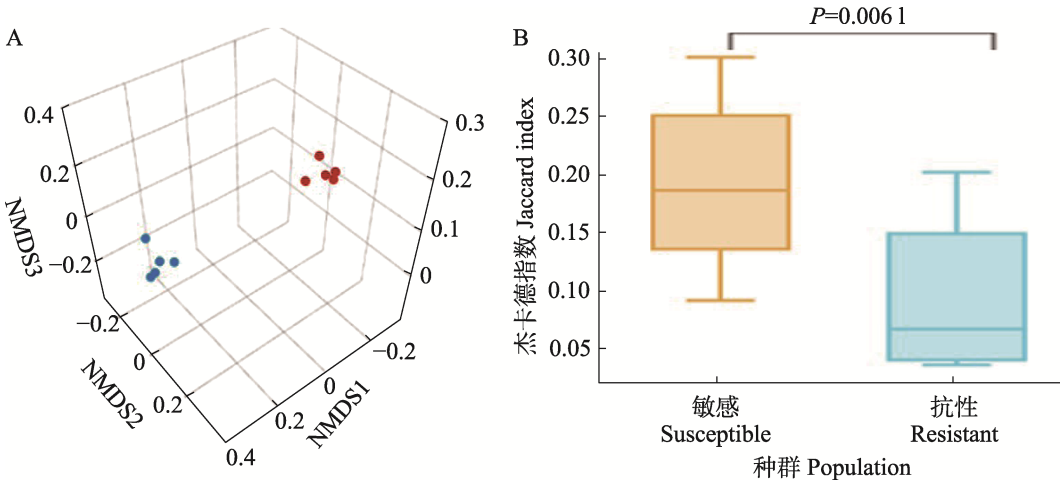


图 2　不同品系斜纹夜蛾的 NMDS 聚类分析及统计检验

Fig. 2　Cluster analysis and statistical test of NMDS of different strains of *Spodoptera litura*

A. NMDS 聚类分析；B. 统计检验（Welch's *T* 检验）。A. NMDS cluster analysis; B. Statistical test (Welch's *T*-test).

及次优势菌纲有明显差异（$P<0.05$），抗性种群斜纹夜蛾的优势菌纲为丹毒丝菌纲（63.73%）和芽孢杆菌纲（27.18%），次优势菌纲为梭菌纲（3.62%）、α-变形菌纲（3.13%）和 γ-变形菌纲（1.84%）。

由图 3（C）可知，从目水平分类上两品系斜纹夜蛾的相对丰度大于 0.1%的共有 10 个目，分别为乳杆菌目 Lactobacillales、丹毒丝菌目 Erysipelotrichales、根瘤菌目 Rhizobiales、β 变形菌目 β-proteobacteriales、梭状芽孢杆菌目 Clostridiales、柄杆菌目 Caulobacterales、假单胞菌目 Pseudomonadales、噬几丁质菌目 Chitinophagales 和叶绿体目 Chloroplast。敏感种群斜纹夜蛾中，乳杆菌目（81.62%）占最优势地位，其次分别是根瘤菌目（4.98%）、叶绿体目（4.83%）、β 变形菌目（4.42%）、丹毒丝菌目（1.61%）、柄杆菌目（1.57%）、噬几丁质菌目（0.62%）和假单胞菌目（0.30%），剩下的梭状芽孢杆菌目不足 0.1%。抗性种群斜纹夜蛾中丹毒丝菌目（63.73%）和乳杆菌目（27.18%）占据主要优势地位，其次分别是梭状芽孢杆菌目（3.62%）、根瘤菌目（2.35%）、β 变形菌目（1.72%）、柄杆菌目（0.78%）、叶绿体目（0.27%）、噬几丁质菌目（0.24%）、假单胞菌目（0.12%）。两品系样品的肠道菌群在目水平组成上有差异。

从图 3（D）可知，从科水平分类上，在科水平上两品系斜纹夜蛾肠道微生物的相对丰度大于 0.1%的共有 10 个科，分别为肠球菌科 Enterococcaceae、明串球菌科 Leuconostocaceae、伯克氏菌科 Burkholderiaceae、根瘤菌科 Rhizobiaceae、乳杆菌科 Lactobacillaceae、丹毒丝菌科 Erysipelotrichaceae、柄杆菌科 Caulobacteraceae、拜叶林克氏菌科 Beijerinckiaceae、噬几丁质菌科 Chitinophagaceae、黄色杆菌科 Xanthobacteraceae、莫拉菌科 Moraxellaceae 和毛螺菌科 Lachnospiraceae。敏感种群斜纹夜蛾肠球菌科（50.91%）和明串球菌科（27.67%）的丰度最高，占优势地位。伯克氏菌科（4.42%）、根瘤菌科（3.37%）、丹毒丝菌科（1.61%）、柄杆菌科（1.57%）和拜叶林克氏菌科（1.20%）占据次优势地位，其中还有未鉴定的含 4.83%。抗性种群里丹毒丝菌科（63.73%）和肠球菌科（26.82%）占据优势地位，明串球菌科（3.62%）、伯克氏菌科（1.72%）和根瘤菌科（1.48%）为次优势地位，其余的菌群丰度不足 1%。在科水平上两品系样品的肠道菌群组成差异显著（$P<0.05$）。

以属为水平分类单位的结果如图 3（E）所示，在属水平上斜纹夜蛾的肠道菌群含有肠球菌属 *Enterococcus*、丹毒丝菌属 *Erysipelatoclostridium*、魏斯氏菌属 *Weissella*、苏黎世杆菌属 *Turicibacter*、罗尔斯通菌属

Ralstonia、中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium*、泰勒菌属 *Tyzzerella_3*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、足癣菌属 *Pediococcus*、*Sediminibacterium*、博斯氏菌属 *Bosea*、短根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和不动杆菌属 *Acinetobacter*。敏感种群斜纹夜蛾的优势菌群主要是肠球菌属（50.91%）和魏斯氏菌属（27.67%），其余占比较少。抗性种群斜纹夜蛾的菌群组成主要是丹毒丝菌属（57.24%）和肠球菌属（26.82%），两种菌属在其菌群组成中丰度最高，占据优势地位，次优势地位的有苏黎世杆菌属（6.49%）、泰勒菌属（3.62%）、罗尔斯通菌属（1.72%）和中慢生根瘤菌属（1.48%），其余占比较少。两品系的肠道菌群属水平组成有明显差异（P<0.05），主要菌属均有肠球菌属，抗性种群的丹毒丝菌属丰度则远多于敏感种群。

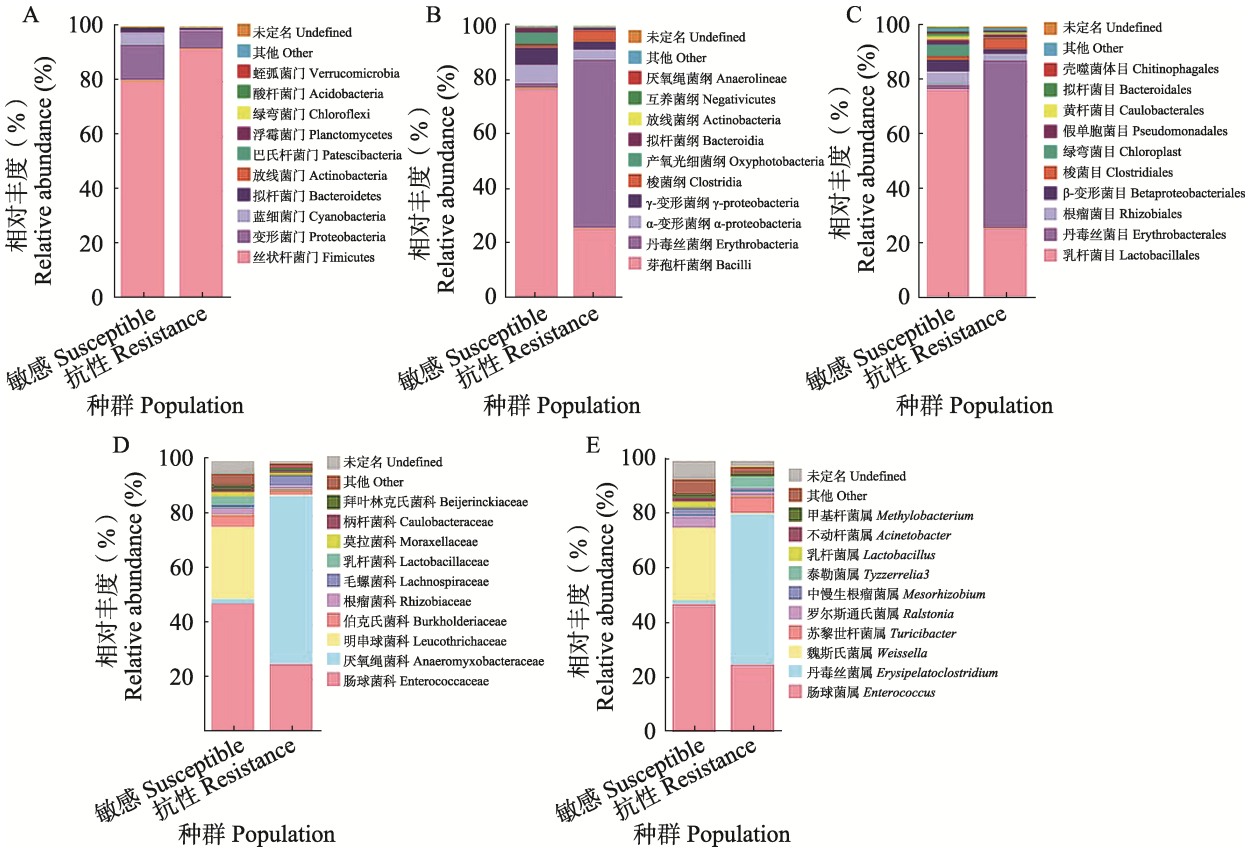


图 3　斜纹夜蛾肠道微生物的组成

Fig. 3　Composition of intestinal microorganisms of *Spodoptera litura*

A. 门；B. 纲；C. 目；D. 科；E. 属。A. Phylum; B. Class; C. Order; D. Family; E. Genus.

2.6　斜纹夜蛾肠道细菌功能预测

KEGG（Kyoto encyclopedia of genes and genomes）功能预测分析显示，斜纹夜抗性种群和敏感种群的肠道细菌的主要生物代谢通路包括新陈代谢（Metabolism）、细胞过程（Cellular processes）、遗传信息处理（Genetic information processing）、环境信息处理（Environmental information processing）、生物系统（Organismal systems）和人类疾病（Human diseases）。主要代谢通路一级水平分类如图 4（A），抗性种群和敏感种群斜纹夜蛾肠道细菌在新陈代谢通路相对丰度最高，是最主要的代谢通路。其中新陈代谢通路可分为碳水化合代谢、氨基酸代谢、辅因子和维生素代谢、其他氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、脂质代谢、能

量代谢、异生菌的生物降解和代谢、其他次级代谢产物的生物合成、聚糖的生物合成与代谢及核苷酸代谢等 11 个子功能。新陈代谢通路二级分类水平分类如图 4（B），敏感种群和抗性种群斜纹夜蛾肠道细菌宏基因组中参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢合成的基因丰度最高，其中抗性种群斜纹夜蛾肠道细菌宏基因组中碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅因子和维生素代谢、其他氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、脂质代谢、能量代谢、其他次级代谢产物的生物合成、聚糖的生物合成与代谢和核苷酸代谢等相关基因丰度均高于敏感种群。

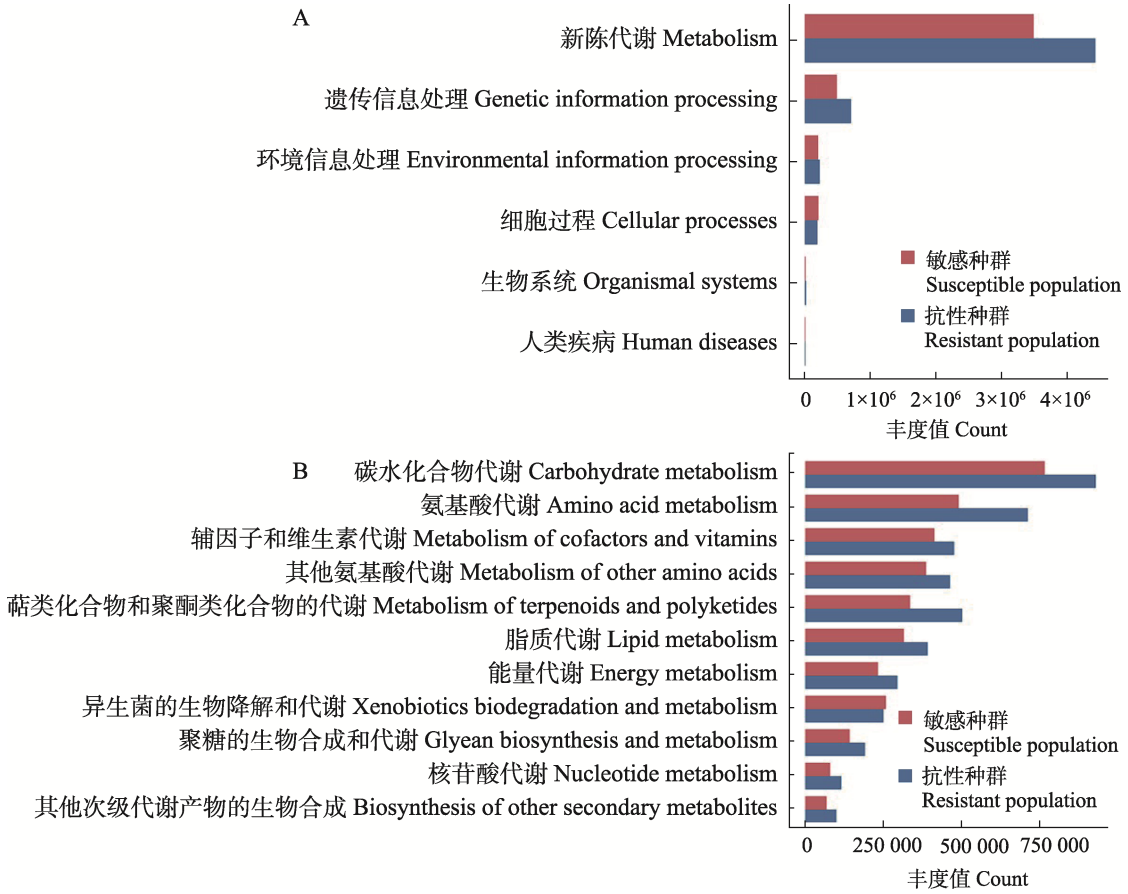


图 4　斜纹夜蛾肠道微生物宏基因组 KEGG 分析

Fig. 4　Metagenomic KEGG analysis of *Spodoptera litura* gut microbiota

A. 代谢通路一级水平分类；B. 图新陈代谢通路二级水平分类。

A. The first-level classification of metabolic pathways; B. The second-level classification of metabolic pathways.

3　讨论

长期以来，昆虫通过与肠道微生物建立共生关系来适应各种环境和食物资源。肠道微生物与昆虫的消化、营养摄取、免疫系统和生理功能等方面密切相关（Engel and Moran, 2013; Habineza *et al*., 2019）。肠道微生物通过产生抗菌物质、竞争资源和调节宿主免疫反应等方式，增强昆虫的抵抗力（Yuval, 2017）；昆虫与其肠道微生物之间的共生关系在进化和农药抗性方面扮演着重要角色（夏晓峰, 2014）。农药的长期暴露会对宿主的肠道菌群造成影响，从而影响其生理代谢，可能使昆虫对农药具有更高的耐受性（张家昊，2020）。因此，了解昆虫与肠道微生物的共生关系，以及农药对该共生关系的影响，对更有效地管理农业害虫和减少害虫对农药抗性的发展。研究肠道微生物对宿主昆虫抗性的影响，明确影响害虫抗性发展的主

要菌群，可为新药剂的研发提供靶标，有助于新药剂的研发。

本研究结果显示，敏感种群和抗性种群的斜纹夜蛾在肠道微生物多样性以及丰富度上存在较大差异，两品系共有 OTUs 129 个，敏感种群特有 OTUs 182 个，抗性种群特有 OTUs 218 个，抗性种群在菌群组成方面要大于敏感种群，这些差异很有可能是抗性种群长期在外界受到复杂环境的选择压力，频繁接触农药，导致肠道菌群变化，这与张家昊（2019）的研究基本一致。本研究多样性分析结果显示，抗性种群样本的物种数多于敏感种群，低丰度菌群在数量上远大于敏感种群，抗性种群的低丰度菌群拥有独特的菌属，如沙雷氏菌属、肠杆菌属、短杆菌属等，这些菌属中具备影响神经递质的功能，溴虫氟苯双酰胺的作用机理是通过抑制 GABA 激活的氯通道，引起昆虫的过度兴奋和抽搐（宋璐璐等, 2022）。也有研究表明，可以通过调控肠道微生物数量影响宿主体内的神经递质（Chen *et al.*, 2021），推测抗性种群低丰度菌群可能协同调控影响斜纹夜蛾对溴虫氟苯双酰胺的抗性。抗性种群样本的均匀度和丰富度低于敏感种群，说明抗性种群样本的优势菌群总占比不如敏感种群，抗性种群的群落多样性要更高。敏感种群的丰度和均匀度更高，原因可能是敏感种群在室内长时间隔离培养，不与外界接触，其群落结构会更加稳定，群落内各物种的数量比较均衡，群落的结构与外界的接触有关，向芸庆等（2010）研究发现，通过给予昆虫不同环境影响，会导致其肠道菌群发生变化，与本研究结果相似。

肠球菌属细菌是可以分泌活性抗菌化合物，一些细菌还能在肠道上形成生物膜状结构，保护幼虫不被病原微生物侵害（Dantur *et al.*, 2015）。丹毒丝菌属在抗衰老作用和脂质代谢作用中起重要影响作用，其具有多种耐药基因，对多种抗菌药物表现出高抗药性（Luo *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022）。本研究结果显示，肠球菌属是斜纹夜蛾肠道细菌的主要菌群之一，在敏感种群中为优势菌属，在抗性种群中为次优势菌属，其在维持斜纹夜蛾生长发育，抵御外界病原微生物侵害虫体的过程中起作用；丹毒丝菌属为抗性种群中占据最优势地位的菌属。后期可以通过离体培养等方法，对两种群的肠球菌属进行研究，探究是否有独特的肠球菌或丹毒丝菌具备介导抗性作用，可为揭示斜纹夜蛾抗双酰胺类药剂机理的阐明提供方向。

肠道细菌功能预测结果显示，抗性种群和敏感种群斜纹夜蛾的肠道细菌群落功能主要是新陈代谢，与蓝波妙（2016）研究结果一致，肠道微生物的代谢功能有助于斜纹夜蛾适应外界环境变化重要作用。通过 KEGG 功能预测表明对溴虫氟苯双酰胺抗性斜纹夜蛾和敏感种群斜纹夜蛾细菌群落功能主要与碳水化合物代谢和氨基酸代谢相关，两种品系的代谢功能仅有一些丰度上的差异，另外敏感种群除了异生菌的生物降解和代谢的相关基因丰度比抗性种群要高，其余新陈代谢相关基因丰度均小于抗性种群，推测可能是抗性种群的斜纹夜蛾对比敏感种群，需要更多的新陈代谢相关的基因去适应外界的复杂食物来源。

本研究通过分析抗性、敏感种群斜纹夜蛾肠道微生物的多样性，发现敏感种群的肠道菌群组成相比抗性种群更稳定保守，抗性种群的肠道菌群组成更为复杂，低丰度菌群数量更多，群落多样性显著高于敏感种群。丹毒丝菌属是抗性种群的优势菌属，主要功能是在脂质代谢上发挥作用。肠球菌属是敏感种群的优势菌属，主要功能是防止病原微生物侵害。本研究探究了肠道微生物与昆虫抗性增加之间的联系，为开发新型农药提供了新思路，为进一步解释斜纹夜蛾抗性提高的作用机理奠定了基础。

参考文献 (References)

Banerjee S, Maiti TK, Roy RN, 2022. Enzyme producing insect gut microbes: An unexplored biotechnological aspect. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(3): 384–402.

Basset Y, Cizek L, Cuénoud P, Didham RK, Guilhaumon F, Missa O, Novotny V, Ødegaard F, Roslin T, Schmidl J, Tishechkin AK, Winchester NN, Roubik DW, Aberlenc HP, Bail J, Barrios H, Bridle JR, Castaño-Meneses G, Corbara B, Curletti

G, da Rocha WD, De Bakker D, Delabie JHC, Dejean A, Fagan LL, Floren A, Kitching RL, Medianero E, Miller SE, de Oliveira EG, Orivel J, Pollet M, Rapp M, Ribeiro SP, Roisin Y, Schmidt JB, Sørensen L, Leponce M, 2012. Arthropod diversity in a tropical forest. *Science*, 338(6113): 1481–1484.

Bo YL 2022. BASF agrochemical R&D and new products launched in recent years. *World Pesticides*, 44(4): 28–40. [柏亚罗, 2022. 巴斯夫农药研发及近年上市新产品. 世界农药, 44(4): 28–40.]

Chen YJ, Xu JY, Chen Y, 2021. Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders. *Nutrients*, 13(6): 2099.

Dantur KI, Enrique R, Welin B, Castagnaro AP, 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5: 15.

De Fine Licht HH, Schiøtt M, Rogowska-Wrzesinska A, Nygaard S, Roepstorff P, Boomsma JJ, 2013. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2): 583–587.

Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.

Gu LL, Bo YL, 2020. Top 15 agrochemicals and newly R&D or launched products of four multinational corporations. *World Pesticides*, 42(9): 31–39. [顾林玲, 柏亚罗, 2020. 全球四大跨国公司的 15 强农药产品及最新研发上市产品(下). 世界农药, 42(9): 31–39.]

Habineza P, Muhammad A, Ji TL, Xiao R, Yin XY, Hou YM, Shi ZH, 2019. The promoting effect of gut microbiota on growth and development of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Dryophthoridae) by modulating its nutritional metabolism. *Front Microbiol*, 10: 1212.

Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T, 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22): 8618–8622.

Lan BM, 2016. Diversity and function of gut bacterialsymbions of *Spodoptera litura*. Master dissertation. Fuzhou: Agriculture and Forestry University. [蓝波妙, 2016. 斜纹夜蛾肠道细菌多样性及其功能研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]

Li GN, Xia XJ, Zhao HH, Long YH, Tang WC, Xin J, Li HG, Zhu Y, 2014. On intestinal bacteria colony morphology of silkworm and enzyme-producing correlation. A*rtificial Intelligence Science and Engineering* (*Natural Science Edition*), 39(12): 53–57. [李冠楠, 夏雪娟, 赵欢欢, 隆耀航, 唐文超, 辛佳, 李汉歌, 朱勇, 2014. 家蚕肠道细菌菌落形态与产消化酶相关性研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 39(12): 53–57.]

Liu J, Wang J, Zhou Y, Han HX, Liu W, Li DP, Li FW, Cao DG, Lei QX, 2022. Integrated omics analysis reveals differences in gut microbiota and gut-host metabolite profiles between obese and lean chickens. *Poultry Science Association*, 101(11): 102165.

Lu QC, He HG, Pu DQ, 2023. Research progress on the species and functions of gut microorganisms in insects. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 2023(2): 48–52. [陆秋成, 何恒果, 蒲德强, 2023. 昆虫肠道微生物种类及其功能研究进展. 四川农业科技, 2023(2): 48–52.]

Lu YX, Liu YQ, Li Q, Xia RX, Wang H, 2016. Research progress on intestinal microbial diversity of insects. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 45(11): 1–7. [鲁迎新, 刘彦群, 李群, 夏润玺, 王欢, 2016. 昆虫肠道微生物多样性研究进展. 河南农业科学, 45(11): 1–7.]

Luo DS, Chen KC, Li JB, Fang ZY, Pang HT, Yin YF, Rong XL, Guo J, 2020. Gut microbiota combined with metabolomics reveals the metabolic profile of the normal aging process and the anti-aging effect of FuFang Zhenshu TiaoZhi (FTZ) in mice. *Biomed Pharmacother*, 121: 109550.

Sang S, Wang Z, Qi JW, Shu BS, Zhong GH, 2013. Research progresses on pesticide resistance of *Spodoptera litura*. *Journal of Environmental Entomology*, 35(6): 808–814. [桑松, 王政, 齐江卫, 舒本水, 钟国华, 2013. 斜纹夜蛾抗药性研究进展. 环境昆虫学报, 35(6): 808–814.]

Sang S, Shu BS, Yi X, Liu J, Hu MY, Zhong GH, 2016. Cross-resistance and baseline susceptibility of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) to cyantraniliprole in the south of China. *Pest Management Science*, 72(5): 922–928.

Sato Y, Jang S, Takeshita K, Itoh H, Koike H, Tago K, Hayatsu M, Hori T, Kikuchi Y, 2021. Insecticide resistance by a host-symbiont reciprocal detoxification. *Nature Communications*, 12(1): 6432.

Song LL, Ai DP, Ju XN, Liu GY, 2022. A novel diamide insecticide-brofanilide. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 24(4): 671–681. [宋璐璐, 艾大朋, 巨修练, 刘根炎, 2022.

新型双酰胺类杀虫剂——溴虫氟苯双酰胺. 农药学学报, 24(4): 671–681.]

Tuan SJ, Lee CC, Chi H, 2014. Population and damage projection of *Spodoptera litura* (F.) on peanuts (*Arachis hypogaea* L.) under different conditions using the age-stage, two-sex life table. *Pest Management Science*, 70(5): 805–813.

Tuan SJ, Yeh CC, Atlihan R, Chi H, Tang LC, 2016. Demography and consumption of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on cabbage and taro. *Journal of Economic Entomology*, 109(2): 732–739.

Wang JF 2020. Study on the production of flubendiamide resistance mediatedby *Serratia marcescens* in the intestine of *Plutella xplostella*. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [王俊峰, 2020. 小菜蛾肠道粘质沙雷氏菌介导的氟苯虫酰胺抗药性产生的研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Xia XF, 2014. Organizational diversity and functional characterization of microbiotain the midgut of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) Master dissertation. Fuzhou: Agriculture and Forestry University. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 硕士学位论文. 福州: 农林大学.]

Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [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.]

Xiang YQ, Wang XQ, Feng W, Zhou W, Xie HX, W YJ, 2010. Comparative analysis of the composition of dominant intestinamicroflora in silkworm reared with different forages. *Acta Ecologica Sinica*, 30(14): 3875–3882. [向芸庆, 王晓强, 冯伟, 周围, 谢洪霞, 万永继, 2010. 不同饲料饲养家蚕其肠道微生态优势菌群类型的组成及差异性. 生态学报, 30(14): 3875–3882.]

Xiao TX, Lu K, 2022. Functional characterization of CYP6AE subfamily P450s associated with pyrethroid detoxification in *Spodoptera litura*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 219: 452–462.

Yuval B, 2017. Symbiosis: Gut bacteria manipulate host behaviour. *Current Biology*, 27(15): R746–R747.

Zhang JH, 2019. Studies on intestinal bacteria in two diamide insecticide-resistant *Plutella xylostella* strains and sereening of bacteria degrading flubendiamide. Marster dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [张家昊, 2019. 两种双酰胺杀虫剂抗性种群小菜蛾肠道细菌的研究及氟苯虫酰胺降解菌的筛选. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Zhang S, Shao ZR, Li YP, 2014. Monitoring results of pesticide resistance of agricultural pest organisms nationwide in 2013 and suggestions on scientific pesticide use. *China Plant Protection*, 34(3): 55–58. [张帅, 邵振润, 李永平, 2014. 2013 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议. 中国植保导刊, 34(3): 55–58.]