DOI：10.13718/j.cnki.xdzk.2019.09.002

重庆地区取食高粱的草地贪夜蛾肠道细菌新分离株的鉴定①

郭志斌[1,2]，　蒋睿轩[1,2]，　唐运林[1,3,4]，　顾偌铖[1,3,4]，
李青晏[1,2]，　行　甜[1,2]，　向　丽[1,2]，　吴燕燕[1,3,4]，
胡　源[5]，　刘　秀[5]，　雷云飞[6]，　韦俊宏[1,3,4]，
潘国庆[1,3,4]，　周泽扬[1,3,4,7]

1. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400715；
2. 西南大学 生物技术学院，重庆 400715；
3. 西南大学 农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室，重庆 400715；
4. 西南大学 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室，重庆 400715；
5. 重庆江津农业科技有限公司，重庆 江津 402289；
6. 重庆市江津区农业技术推广中心，重庆 江津 402260；
7. 重庆师范大学 生命科学学院，重庆 401331

摘要：为充分认识入侵重庆地区草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的肠道微生物，2019 年 7 月该课题组再次在重庆江津地区高粱地采集了草地贪夜蛾幼虫，通过分离培养结合 16S rDNA 测序鉴定，从江津草地贪夜蛾幼虫肠道中共分离得到 38 个细菌分离株，归为 9 个属，分别为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*). 在课题组前期研究的基础上，新分离到了 6 个属，分别为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*). 同时还对入侵重庆地区采食高粱和玉米的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌分离株进行了比较分析，只在采食高粱的草地贪夜蛾幼虫肠道中发现了欧文氏菌属(*Erwinia*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)的菌株，而气单胞菌属(*Aeromonas*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和类香味菌属(*Myroides*)则只在采食玉米的草地贪夜蛾幼虫肠道中分离得到. 通过对同一片江津高粱地的草地贪夜蛾和玉米黏虫(*Mythimna separata*)的肠道细菌分离株进行比较分析，只在草地贪夜蛾肠道中发现了微球菌属(*Micrococcus*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)，而金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)只发现于玉米黏虫肠道中.

关　键　词：重庆地区；草地贪夜蛾；肠道细菌；高粱；玉米

中图分类号：Q969.436.5；Q93-331　　**文献标志码：A**　　**文章编号：**1673－9868(2019)09－0009－08

---

① 收稿日期：2019－08－18
基金项目：中央高校基本科研业务费团队项目(XDJK2018AA001)；家蚕基因组生物学国家重点实验室自设课题(2019-03)；中央高校基本科研业务费面上项目(XDJK2019C010).
作者简介：郭志斌(1998－)，男，主要从事昆虫肠道微生物研究；蒋睿轩(共同贡献者)(1998－)，男，主要从事昆虫肠道微生物研究.
通信作者：韦俊宏，博士，讲师；潘国庆，博士，研究员，博士研究生导师.

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)又称秋黏虫(Fall armyworm, FAW),起源于美洲热带和亚热带地区[1],具有迁飞能力强、生活周期短和寄主范围广等特点,2017年被国际农业及生物科学中心(CABI)评为世界十大植物害虫之一[2]. 该虫于2019年1月开始入侵我国云南省,并迅速向北迁飞,对我国的主要农作物造成了极大的威胁[2-5].

昆虫肠道为微生物的定植提供了独特的环境,而肠道菌群也在与宿主的长期协同进化过程中形成了稳定的相互作用关系,对宿主的营养、发育、生殖以及行为产生了重要的影响[6-9]. Wu等人[10]研究发现草翅叶蝉(*Homalodisca coagulata*)中有两种专性共生菌*Baumannia cicadellinicola*和*Sulcia muelleri*,前者可以合成维生素和辅酶因子,后者可以合成大部分宿主所必需的氨基酸,以满足宿主生长发育的需要. Shen等人[11]发现烟草甲(*Lasioderma serricorne*)体内的酵母类共生体(*Symbiotaphrina kochii*)能够利用植物化感物质和真菌毒素等作为碳源,从而起到解毒的作用,例如,该类微生物能够水解有机磷杀虫剂对硫磷. 目前已有大量研究证实昆虫的肠道菌群有助于昆虫的营养代谢、生长发育和环境适应,参与昆虫的免疫防御系统,抵御寄生虫、病原体的入侵,影响昆虫的寿命,甚至介导种内和种间的通讯[6-9,12-13]. 因此,开展昆虫肠道菌群在信息素生成、农药降解和抵抗微生物入侵等方面的作用研究,对害虫生物防治以及新农药的开发上具有重大的意义[14-15].

本课题组在前期实验中分离鉴定了重庆地区采食玉米和高粱的草地贪夜蛾肠道微生物[16-19],从采食玉米的幼虫肠道共分离出8个属的细菌,在采食高粱的草地贪夜蛾肠道中仅分离到了5个属的细菌,可能与首次采集的害虫样本数量较少有关. 因此,为进一步比较分析采食不同食物的草地贪夜蛾之间的肠道细菌,课题组再次采集了重庆江津地区高粱地的草地贪夜蛾幼虫50余头,通过传统培养方法分离其肠道细菌,并通过16S rDNA测序对分离株进行鉴定,新分离得到6个属的细菌,并对重庆地区采食高粱叶和玉米叶的草地贪夜蛾以及玉米黏虫肠道优势细菌进行了比较分析.

1 材料与方法

1.1 实验材料

草地贪夜蛾幼虫采自于重庆江津地区高粱地和巫山地区玉米地.

1.2 实验用的培养基

改良LB培养基(LBG):胰蛋白胨10.0 g,酵母提取物5.0 g,NaCl 10.0 g,葡萄糖5.0 g,琼脂15.0 g,加蒸馏水至1 000 mL.

1.3 主要试剂

TE25S溶液:25 mmol/L Tris-HCl,25 mmol/L EDTA,0.3 mol/L蔗糖;DNA提取液:Tris饱和酚/氯仿/异戊醇混合液(各组分体积比为25∶24∶1,pH>7.8);微生物裂解直接PCR试剂盒,Takara;PCR扩增引物27F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′,1492R:5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;1×Taq MasterMix(purple),北京博迈德基因技术有限公司.

1.4 草地贪夜蛾幼虫中肠内容物及粪便的收集

采样自江津地区的草地贪夜蛾幼虫喂食高粱叶饲养,采样自巫山地区的草地贪夜蛾幼虫喂食玉米叶饲养,收集新鲜粪便加入1 mL灭菌的磷酸缓冲液(PBS),震荡制成粪便原液;于超净工作台中,用75%乙醇对幼虫进行表面消毒后,解剖取其中肠置于装有1 mL灭菌的磷酸缓冲液(PBS)的1.5 mL离心管中,震荡混合制成肠道内容物悬液.

1.5 肠道微生物的分离培养

各取50 μL粪便原液和肠道原液分别加入450 μL磷酸缓冲液(PBS),梯度稀释后得到10^{-1}~10^{-9}稀释度的粪便液和肠道液,取10^{-3}~10^{-9}的稀释液100 μL涂布至LB培养基中,30 ℃培养箱培养24~72 h后挑取不同形态特征的单菌落划线培养,通过多次单菌落划线以获得纯分离株.

1.6 肠道细菌的分子鉴定

提取肠道细菌分离株基因组采用方法一:

1) 超净工作台中挑取单菌落至装有50 μL裂解缓冲液的PCR管中;

2) 80 ℃热变性15 min后,低速离心,吸取5 μL裂解后的上清液作为模板;

3）用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增，扩增体系如下：模板 5 μL，引物 27F/1492R 各 1 μL，1×TaqMaster(purple)43 μL. PCR 反应程序为：96 ℃，预变性 10 min；96 ℃，变性 30 s；55 ℃，退火 30 s；72 ℃，延伸 1 min 30 s，35 个循环；72 ℃，延伸 10 min. 将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序.

用方法一提取部分细菌分离株基因组时，PCR 后无法得到有效的扩增产物，则改用基因组提取方法二：

1）吸 1 mL LBG 液体培养基于 1.5 mL 离心管中，挑取单菌落于管中，置于 30 ℃摇床培养 6 h；

2）以 1 000 r/min 的转速离心 5 min，收集菌体，弃上清液；

3）加入 500 μL TE25S 溶液重悬菌体；

4）加入 10 μL 50 g/L 溶菌酶溶液，轻柔混合，37 ℃静置 30～60 min；

5）加入 5 μL 20 g/L 蛋白酶 K，30 μL 10%SDS；

6）混匀，55 ℃温育 60 min(每隔 10～15 min 取出并上下颠倒混匀一次)；

7）加入 100 μL 5 mol/L NaCl，上下颠倒混匀；

8）加入 65 μL CTAB/NaCl 混合液(0.7 mol/L NaCl，10%CTAB)；

9）混合均匀后，55 ℃静置 10 min；

10）取出冷却至室温，加入 400 μL DNA 提取液，震荡混匀 5～10 min；

11）在 4 ℃温度下，以 12 000 r/min 的转速离心 10 min；

12）将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，重复几次，直至无白色中间层；

13）将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积的异丙醇混合均匀；

14）在 4 ℃温度下，以 12 000 r/min 的转速离心 10 min；

15）弃去上清液，加入 75%乙醇，颠倒混匀，在 4 ℃温度下，以 12 000 r/min 的转速离心 10 min，重复一次；

16）弃去上清液，晾干后加入 50～100 μL ddH_2O；

17）用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增，扩增体系如下：模板 5 μL，引物 27F/1492R 各 1 μL，1×TaqMaster(purple)43 μL. PCR 反应程序为：96 ℃，预变性 10 min；96 ℃，变性 30 s；55 ℃，退火 30 s；72 ℃，延伸 1 min 30 s，35 个循环；72 ℃，延伸 10 min. 将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序.

1.7　数据分析

将测序结果在 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行序列比对，下载同源性较高的序列，使用 MEGA 5.0 进行多重序列比对[20]，并构建系统发育树进行分析. 同时将获得的 16S rDNA 基因序列在 RDP 数据库的 Classifer 程序(https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp)进行比对，获得同源性较高序列的相关信息.

2　结果与分析

2.1　江津地区高粱地草地贪夜蛾幼虫肠道细菌分子鉴定

本次实验从江津采集的草地贪夜蛾幼虫肠道中分离获得 38 个分离株，利用细菌通用引物 27F/1492R 对 38 个分离株进行 PCR 扩增测序得到其 16S rDNA 序列. 利用 Blastclust 对 38 个测序结果及本课题组先前数据[19]进行同源聚类分析，同源性大于 97%为一个聚类单元，共获得 20 个聚类单元(表 1).

将测序结果在 GenBank 和 RDP 两个数据库中比对获得相关信息，比对结果显示在本次从重庆江津高粱地草地贪夜蛾幼虫肠道分离得到 38 个细菌分离株中，JJSF2-1，JJSF2-2，JJSF2-3，JJSF2-5，JJSF2-15，JJSF2-17，JJSF2-19，JJSF2-24，JJSF2-34，JJSF2-36 属于克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)；JJSF2-4，JJSF2-27 属于肠球菌属(*Enterococcus*)；JJSF2-6，JJSF2-7，JJSF2-33，JJSF2-37 属于微球菌属(*Micrococcus*)；JJSF2-8，JJSF2-38 属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*)；JJSF2-9，JJSF2-10，JJSF2-28 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)；JJSF2-11，JJSF2-12，JJSF2-13，JJSF2-14，JJSF2-18，JJSF2-20，JJSF2-21，JJSF2-22，JJSF2-23，JJSF2-26，JJSF2-29，JJSF2-30，JJSF2-32，JJSF2-35 属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)；JJSF2-16 属于寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)；JJSF2-25 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)；JJSF2-31 属于鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*). 其中克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylo-*

coccus)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)6个属，在前期对采食高粱的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌分离实验中未分离到.不动杆菌属(*Acinetobacter*)的分离株在聚类分析中分为4个聚类单元，克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)各分为2个聚类单元；其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)丰度最高，其次是克雷伯氏菌属(*Klebsiella*).在本次从重庆巫山玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道分离得到的5个细菌分离株中，WS3-2,WS3-3,WS3-4属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)；WS3-1,WS3-5属于类香味菌属(*Myroides*).其中，类香味菌属(*Myroides*)在前期对巫山的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌分离实验中未分离到.

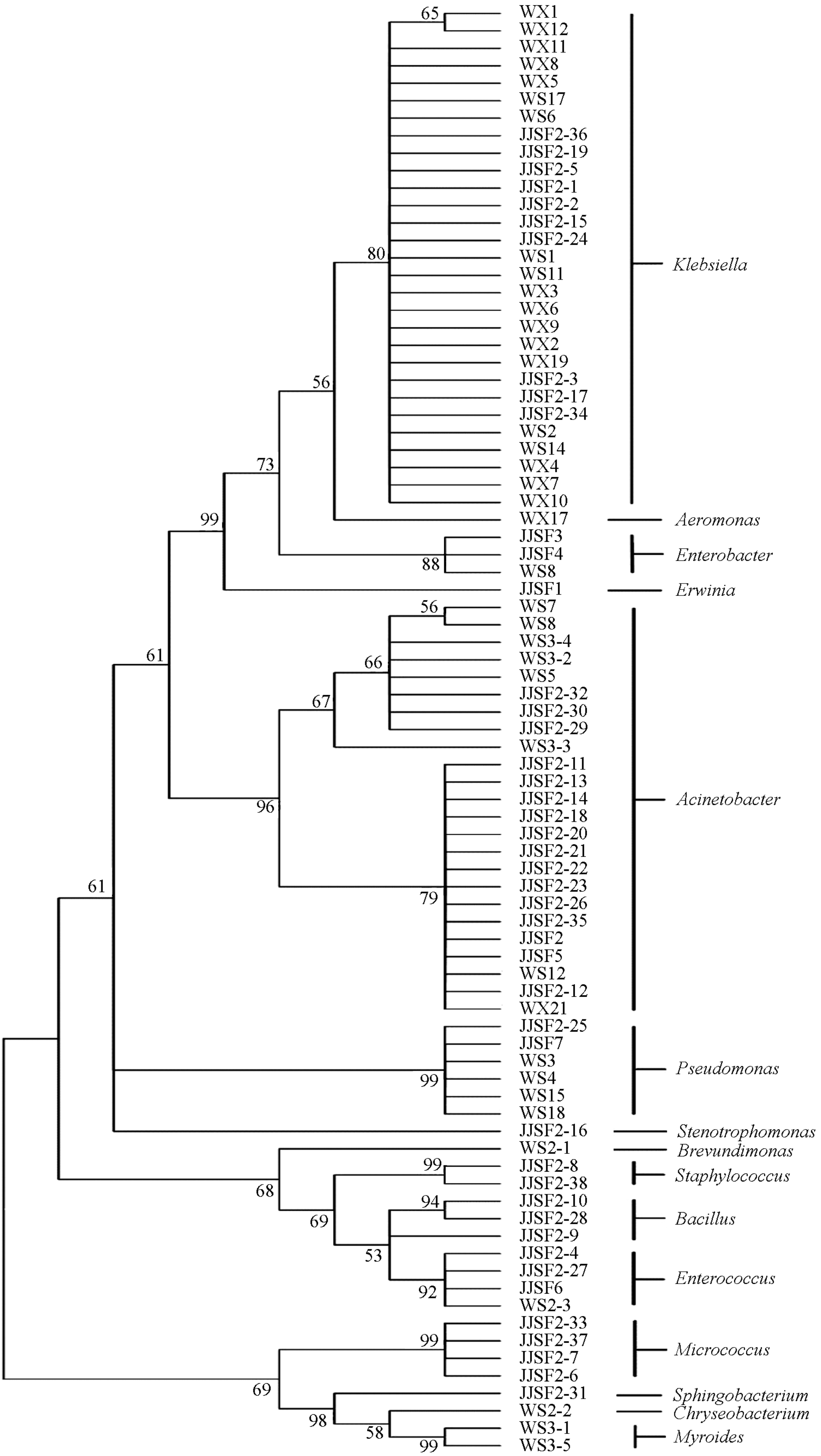
表1 江津草地贪夜蛾幼虫肠道细菌分离株种属统计

OTU ID	采样时间		NCBI ID	RDP ID
	7月17日	6月30日		
OTU 1	JJSF2-11，JJSF2-13 JJSF2-14，JJSF2-20 JJSF2-21，JJSF2-22 JJSF2-26，JJSF2-29 JJSF2-32，JJSF2-35	NA	*Acinetobacter*	*Acinetobacter*
OTU 2	JJSF2-12，JJSF2-18 JJSF2-23，JJSF2-30	NA	*Acinetobacter*	*Acinetobacter*
OTU 3	NA	JJSF5	*Acinetobacter*	*Acinetobacter*
OTU 4	NA	JJSF2	*Acinetobacter*	*Acinetobacter*
OTU 5	JSF2-1，JJSF2-2 JJSF2-3，JJSF2-5 JJSF2-17，JJSF2-19	NA	*Klebsiella*	*Klebsiella*
OTU 6	JJSF2-15，JJSF2-24 JJSF2-34，JJSF2-36	NA	*Klebsiella*	*Klebsiella*
OTU 7	JJSF2-4，JJSF2-27	NA	*Enterococcus*	*Enterococcus*
OTU 8	NA	JJSF6	*Enterococcus*	*Enterococcus*
OTU 9	JJSF2-10，JJSF2-28	NA	*Bacillus*	*Bacillus*
OTU 10	JJSF2-9	NA	*Bacillus*	*Bacillus*
OTU 11	JJSF2-8，JJSF2-38	NA	*Staphylococcus*	*Staphylococcus*
OTU 12	JJSF2-6，JJSF2-7	NA	*Micrococcus*	*Micrococcus*
OTU 13	JJSF2-33，JJSF2-37	NA	*Micrococcus*	*Micrococcus*
OTU 14	JJSF2-16	NA	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas*
OTU 15	JJSF2-25	NA	*Pseudomonas*	*Pseudomonas*
OTU 16	NA	JJSF7	*Pseudomonas*	*Pseudomonas*
OTU 17	NA	JJSF4	*Enterobacter*	*Enterobacter*
OTU 18	NA	JJSF3	*Enterobacter*	*Enterobacter*
OTU 19	JJSF2-31	NA	*Sphingobacterium*	*Sphingobacterium*
OTU 20	NA	JJSF1	*Erwinia*	*Erwinia*

注：NA表示未分离得到.

2.2 江津地区以高粱为食的草地贪夜蛾幼虫与巫山、巫溪地区以玉米为食的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌比较

为了探究食物差异对草地贪夜蛾幼虫肠道细菌组成结构的影响，结合课题组前期的数据[17-19]，对分离自江津高粱地草地贪夜蛾幼虫肠道的45个分离株和分离自巫山、巫溪玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道的38个分离株进行系统发育树分析(图1).



JJSF：江津草地贪夜蛾；WS：巫山草地贪夜蛾；WX：巫溪草地贪夜蛾.

图 1　江津高粱地和巫山、巫溪玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道细菌系统发育分析

结果显示克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)在江津、巫山以及巫溪的草地贪夜蛾幼虫肠道中广泛存在，分别占所有分离株的34.9%和28.9%. 在江津高粱地、巫山以及巫溪玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道中都分离到克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)；而欧文氏菌属(*Erwinia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微球菌属(*Micrococcus*)，只在江津高粱地草地贪夜蛾幼虫肠道中分离得到；气单胞菌属(*Aeromonas*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和类香味菌属(*Myroides*)仅在巫山和巫溪玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道中分离得到. 采食玉米的草地贪夜蛾幼虫肠道中的鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)细菌是在后续研究中课题组进一步从巫山草地贪夜蛾幼虫肠道中鉴定到的(数据未发表). 比较结果表明草地贪夜蛾幼虫肠道细菌组成在一定程度上受到食物和地域环境的影响，但某些细菌如不动杆菌属(*Acinetobacter*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等在草地贪夜蛾幼虫肠道中普遍存在.

3 结　论

肠道微生物在宿主的发育、抗性、营养和生理等方面发挥着重要作用，利用肠道细菌来维持肠道稳态和治疗疾病长期以来一直是生物医学的热点，同时肠道细菌在害虫防控方面具有很好的前景[9]. 在利用昆虫不育技术控制地中海果蝇(*Ceratitis capitata*)的研究中发现，工厂饲养的γ-辐照不育雄性地中海果蝇在吸引及与野生雌性交配方面能力较弱，通过分析其肠道微生物群的结构发现，在利用γ-辐照使雄性地中海果蝇不育的过程中对其肠道微生物群落结构造成了影响，其中克雷伯氏菌的水平显著降低，潜在致病菌假单胞菌增加. 而在辐照后的食物中添加产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)后，不育雄性地中海果蝇的竞争力显著提高[21]. 宿主体内的肠道微生物结构受到遗传背景、饮食以及环境等因素的影响，在一项分析3种取食不同寄主植物的植食性叶蜂肠道菌群的研究中发现，3种叶蜂的肠道菌群组成与其各自取食的寄主植物密切相关[22]. 草地贪夜蛾是一种杂食性害虫，寄主植物广泛，有玉米、水稻、高粱、谷子、甘蔗、小麦、棉花、花生和大豆等，研究取食不同食物的草地贪夜蛾肠道细菌的差异，对研究草地贪夜蛾肠道的核心菌群以及食物对草地贪夜蛾肠道菌群结构的影响提供了基础.

本研究通过纯培养的方法，对来自江津高粱地和巫山玉米地草地贪夜蛾幼虫的肠道细菌进行分离培养并结合16S rDNA进行初步鉴定. 在江津高粱地草地贪夜蛾幼虫肠道中新分离鉴定到前期未报道的6个菌属，分别为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)；此外，在巫山玉米地草地贪夜蛾幼虫肠道中进一步分离鉴定到前期未报道的类香味菌属(*Myroides*). 本课题组从草地贪夜蛾幼虫肠道获得的所有分离株中，克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)的比例最高，占所有分离株的34.9%，不动杆菌属(*Acinetobacter*)其次，占所有分离株的28.9%；克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)在江津高粱地实验组中占22.2%，在巫山及巫溪玉米地组中占50%；不动杆菌属(*Acinetobacter*)在江津高粱地实验组中占35.6%，在巫山及巫溪玉米地组中占21.1%，推测克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)对草地贪夜蛾的生理生化具有重要作用. 此外，在高粱地和玉米地草地贪夜蛾肠道中分离的菌株存在差异，只在江津高粱地草地贪夜蛾的幼虫肠道中分离到欧文氏菌属(*Erwinia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微球菌属(*Micrococcus*)的菌株，而气单胞菌属(*Aeromonas*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和类香味菌属(*Myroides*)仅分离于巫山及巫溪玉米地草地贪夜蛾的幼虫肠道中. 其中气单胞菌属(*Aeromonas*)仅在巫溪草地贪夜蛾幼虫肠道中分离得到，短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和类香味菌属(*Myroides*)仅分离自巫山草地贪夜蛾幼虫肠道，推测是由于食物以及地域生态环境导致的差异.

从采集自同一片江津高粱地的草地贪夜蛾幼虫和玉米黏虫肠道中都分离到克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)5个属的细菌；而微球菌属(*Micrococcus*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)5个属仅分离于草地贪夜蛾幼虫

肠道中，金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)仅分离于玉米黏虫肠道中，虽然生长在同一地区且采食同一物种，但草地贪夜蛾和玉米黏虫肠道细菌组成存在差异，推测是由于宿主特异性或者挑斑鉴定的随机性导致的.

本研究通过纯培养的方法分离获得草地贪夜蛾幼虫的肠道细菌群数据，结合课题组前期的数据[17-19]，探究了不同地区取食不同食物的草地贪夜蛾幼虫肠道细菌的差异和同一地区相同食物的草地贪夜蛾幼虫和玉米黏虫肠道细菌的差异. 研究结果表明昆虫肠道细菌组成受到食物、环境和物种差异的影响. 但本实验采用的培养条件单一，缺乏在微生物的培养基偏好、温度、湿度等生长条件上做更多的探索，这对草地贪夜蛾肠道细菌组成的鉴定造成了影响，因此在后续研究中需要尝试更多的培养条件以拓展纯培养微生物的多样性，并运用组学的方法对不可纯培养的微生物群进行研究.

参考文献：

[1] SPARKS A N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm [J]. The Florida Entomologist, 1979, 62(2): 82-87.

[2] 胡朝兴，杨茂发，郅军锐，等. 重大入侵害虫草地贪夜蛾对贵州省农业生产的潜在危害分析及其防控 [J]. 山地农业生物学报，2019，38(3)：1-5.

[3] 葛世帅，何莉梅，和　伟，等. 草地贪夜蛾的飞行能力测定 [J/OL]. 植物保护：1-8(12019-07-01) [2019-08-17]. https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019322.

[4] 刘　杰，姜玉英，杨普云. 草地贪夜蛾发生形势和监测防控对策建议 [J]. 农民科技培训，2019(7)：31-34.

[5] 卢增斌，李丽莉，张晴晴，等. 草地贪夜蛾对山东省玉米的危害风险及其监测防控研究进展 [J]. 山东农业科学，2019，51(6)：160-168.

[6] 陈勃生，鲁兴萌，邵勇奇. 鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用 [J]. 昆虫学报，2017，60(6)：710-722.

[7] 郭　军，吴　杰，邓先余，等. 昆虫肠道菌群的功能研究进展 [J]. 应用昆虫学报，2015，52(6)：1345-1352.

[8] 周洪英，孙　波，吴洪丽，等. 昆虫肠道微生物功能及家蚕肠道微生物研究进展 [J]. 北方蚕业，2015，36(4)：1-4，33.

[9] ENGEL P, MORAN N A. The Gut Microbiota of Insects-Diversity in Structure and Function [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 699-735.

[10] WU D Y, DAUGHERTY S C, VAN AKEN S E, et al. Metabolic Complementarity and Genomics of the Dual Bacterial Symbiosis of Sharpshooters [J]. PLoS Biology, 2006, 4(6): 1079-1092.

[11] SHEN S K, DOWD P F. Detoxification Spectrum of the Cigarette Beetle Symbiont *Symbiotaphrina kochii* in Culture [J]. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 1991, 60(1): 51-59.

[12] CHEN B S, TEH B S, SUN C, et al. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29505-1-29505-14.

[13] 刘　莉，王中康，俞和韦，等. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析 [J]. 微生物学报，2008，48(5)：616-622.

[14] HE C, NAN X N, ZHANG Z Q, et al. Composition and Diversity Analysis of the Gut Bacterial Community of the Oriental Armyworm, *Mythimna separata*, Determined by Culture-Independent and Culture-Dependent Techniques. [J]. Journal of insect science (Online), 2013, 13(165): 1-11.

[15] ESKI A, DEMIR Í, GÜLLÜ M, et al. Biodiversity and Pathogenicity of Bacteria Associated with the Gut Microbiota of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). [J]. Microbial pathogenesis, 2018, 121: 350-358.

[16] 唐运林，顾偌铖，吴燕燕，等. 入侵重庆地区的草地贪夜蛾种群生物型鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版)，2019，41(7)：1-7.

[17] 唐运林，吴燕燕，顾偌铖，等. 重庆地区草地贪夜蛾肠道细菌的分离鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版)，2019，41(7)：8-14.

[18] 顾偌铖，唐运林，吴燕燕，等. 重庆巫山地区采食玉米的草地贪夜蛾肠道细菌的分离鉴定补遗 [J]. 西南大学学报(自然科学版)，2019，41(8)：1-5.

[19] 顾偌铖，唐运林，吴燕燕，等. 重庆地区取食高粱的草地贪夜蛾与玉米黏虫肠道细菌比较 [J]. 西南大学学报(自然科学版)，2019，41(8)：6-13.

[20] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. [J]. Molecular Biology and Evolution,

2011, 28(10): 2731-2739.

[21] AMI E B, YUVAL B, JURKEVITCH E. Manipulation of the Microbiota of Mass-Reared Mediterranean Fruit Flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Improves Sterile Male Sexual Performance. [J]. The ISME Journal, 2010, 4(1): 28-37.

[22] 张帅帅,南小宁,王云果,等. 基于PCR-DGGE技术的3种植食性叶蜂幼虫肠道细菌群落结构分析[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(5): 154-160.

Identification of New Isolates of Gut Bacteria of *Spodoptera frugiperda* Feeding on Sorghum in Chongqing Area

GUO Zhi-bin[1,2], JIANG Rui-xuan[1,2], TANG Yun-lin[1,3,4], GU Ruo-cheng[1,3,4], LI Qing-yan[1,2], XING Tian[1,2], XIANG Li[1,2], WU Yan-yan[1,3,4], HU Yuan[5], LIU Xiu[5], LEI Yun-fei[6], WEI Jun-hong[1,3,4], PAN Guo-qing[1,3,4], ZHOU Ze-yang[1,3,4,7]

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. School of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
3. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China;
4. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Chongqing 400715, China;
5. Chongqing Jiangjin Agricultural Technology Limited, Jiangjin Chongqing 402289, China;
6. Chongqing Jiangjin Agricultural Technology Extension, Jiangjin Chongqing 402260, China;
7. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: In order to fully understand the intestinal microbes of *Spodoptera frugiperda* which migrated to Chongqing, our team recently collected again the *S. frugiperda* larvae feeding on sorghum in July of 2019. Through isolation, culture and 16S rDNA sequencing, we obtained 38 isolates of bacteria from the gut of *S. frugiperda* in sorghum fields in Jiangjin, which belonged to 9 genera, including *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Sphingobacterium*. Compared with our previous research, 6 unreported genera were identified, including *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* and *Sphingobacterium*. At the same time, we also conducted a comparative analysis of the intestinal bacteria isolates of *S. frugiperda* feeding on sorghum and on corn. Strains of *Erwinia*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Stenotrophomonas* were found only in the gut of *S. frugiperda* feeding on sorghum, and *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium* and *Myroides* were isolated only from the *S. frugiperda* feeding on corn. A comparison of the larvae intestinal bacterial isolates of *S. frugiperda* and *Mythimna separata* in the same sorghum field in Jiangjin showed that *Micrococcus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Sphingobacterium* were found only in the gut of *S. frugiperda*, while *Chryseobacterium* was found only in the gut of *M. separata*.

Key words: Chongqing area; fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*); intestinal bacteria; sorghum; corn

责任编辑 潘春燕