

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(6):828-834; 4 June 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

对 Bt 蛋白抗性和敏感的棉铃虫中肠细菌群落的比较

姜玮瑜^{1,2}, 梁革梅², 林毅¹, 束长龙², 宋福平², 张杰^{2*}

(¹ 华侨大学化工学院, 厦门 361021)

(² 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】通过比较 Cry1Ac 蛋白抗性及敏感棉铃虫中肠细菌群落的结构组成, 研究中肠微生物是否与棉铃虫 Bt 抗性产生有关。【方法】首先提取了棉铃虫中肠微生物基因组 DNA, 通过 PCR 扩增获得了 16S rDNA 全长片段及 V3 区。采用基于 16S rDNA 的免培养技术—16S rDNA 文库建立和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 研究了国内特有的 Bt 抗性和敏感品系棉铃虫中肠细菌群落组成, 并对其进行分析和比较。【结果】16S rDNA 文库测序结果表明, 抗性品系与敏感品系棉铃虫中肠细菌群落特别是优势菌群非常相似, 但在部分劣势菌群上存在差异。抗性品系中主要优势菌有: 不可培养微生物 (Uncultured bacterium) 占 56.4%, 鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) 占 17.0%, 铅黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*) 占 17.0%; 敏感品系中主要优势菌为不可培养微生物 (Uncultured bacterium) 60.2%, 鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) 占 19.3%, 铅黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*) 占 14.7%。随后进行的 PCR 验证表明, 部分有差异的劣势菌在两种品系虫体都存在。DGGE 图谱分析表明, 这两个品系棉铃虫中肠菌群相似性达到 92.3%。【结论】敏感品系与抗性品系棉铃虫肠道菌群组成极其相似, 推测抗性的产生与肠道微生物无直接关系。

关键词: 棉铃虫; 中肠菌群; 16S rDNA; 变性梯度凝胶电泳; 抗性; 苏云金芽孢杆菌

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0828-07

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 产生的杀虫晶体蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种农业害虫具有特异杀虫活性^[1], 其产品已经广泛地应用于农业、林业害虫的防治。目前, 编码杀虫蛋白的多种 *cry* 基因经修饰和改造已被成功导入多种植物中, 并成功地应用于商业化^[2]。随着 Bt 杀虫剂的大量使用, 导致害虫对杀虫晶体蛋白产生了抗性。自 McGaughey 等报道印度谷斑螟 (*Plodia interpunctella*) 对 Bt 产生抗性以来^[3], 通过室内筛选已经获得多种 Bt 抗性昆虫^[4-5]。在田间或和温室大棚也分别发现了具有 Bt 抗性的小菜蛾 (*Plutella xylostella*)^[6-7] 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)^[8]。并且, 随着转基因抗虫作物的大量种植, 害虫的抗性风

险也在逐年上升^[9]。害虫抗性的产生向 Bt 制剂和抗虫转基因作物的高效/可持续利用提出了巨大挑战。因此, 开展昆虫的抗性机制的研究, 探索延缓和克服这些抗性的产生的新对策、新途径, 成为当今 Bt 研究领域最为活跃的热点课题。

昆虫肠道是众多微生物的良好生活环境, 在长期的进化过程中, 肠道微生物与其宿主形成了共生关系, 肠道微生物对其宿主的生长发育起着非常重要的作用, 共生菌有利于昆虫的繁殖、消化、营养物质的摄取和信息素的合成等^[10-14]。2006 年, Broderick 等首次从中肠微生物角度出发, 发现舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 中肠细菌—肠杆菌 (*Enterobacter* sp. NAB3) 是 Bt 杀虫活性的发挥所必

基金项目: 国家重大基础研究发展规划项目 (国家“973 项目”) (2007CB109203, 2009CB118902)

* 通信作者。Tel: +86-10-62815921, Fax: +86-10-62812642; E-mail: jzhang@ippeaas.cn

作者简介: 姜玮瑜 (1983-), 女, 江西人, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子生态。E-mail: weiyuwxq@hqu.edu.cn

收稿日期: 2009-12-01; **修回日期:** 2010-03-12

需的^[15]。2009年,他们将研究对象扩大到六种鳞翅目供试昆虫,验证了之前的研究结果,还发现 Bt 活性与中肠微生物的关系与昆虫种类有关^[16]。但是就在同年,Ben Raymond 等研究了 Bt 杀虫活性与小菜蛾(*Plutella xylosetella*)中肠细菌的关系,研究发现,昆虫中肠微生物不是 Bt 发挥杀虫活性所必需的^[17]。

本文通过比较室内人工筛选获得的抗性倍数近 3000 倍的国内特有的高抗品系^[18]与敏感品系棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)中肠微生物群落组成,初步探讨中肠微生物群落是否与棉铃虫抗性相关。利用本实验室已经建立的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析昆虫中肠微生物菌群的方法^[19],结合建立 16S rDNA 文库,对 Cry1Ac 蛋白抗性和敏感棉铃虫的中肠细菌群落进行了分析比较。这些工作的开展,将丰富微生物分子生态学研究方法,并为进一步研究昆虫对 Bt 的抗性机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: *Taq* Plus DNA 聚合酶购自 TIANGEN 公司; *Alu* I 和 *Sac* I 等限制性内切酶、连接酶、pMD19-T 载体均购自 TaKaRa 公司; SYBR Green I 购自 AMRESCO 公司,其它生化试剂均为分析纯。基因组 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, USA), PCR 产物凝胶回收试剂盒 AxyGEN DNA Gel Extraction Kit (AxyGEN, USA)。

PCR 仪型号为 Thermocycle (德国 Biometra 公司); DGGE 仪器型号为 DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA); DGGE 凝胶成像系统为 Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, USA)。

1.1.2 供试棉铃虫: 敏感品系(简称 96S): 1996 年采自河南省新乡常规棉田,在室内用人工饲料饲养至今,未接触任何杀虫剂。Cry1Ac 蛋白抗性品系(简称 BtR): 源于 96S 品系,室内用 Cry1Ac 蛋白人工筛选了 95 代、抗性倍数近 3000 倍。2 种试虫均由中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组提供。用正常人工饲料饲喂两种棉铃虫幼虫至三龄,饲养方法参照文献[20]。

1.2 棉铃虫解剖及中肠细菌基因组 DNA 的提取

选择 3 龄的棉铃虫,放入 75% 的酒精中浸泡 10 s,在无菌操作下取出虫体并放在 0.1% 氯化汞(HgCl₂)中消毒 2 min,移入无菌水中清洗,在无菌

平皿中进行解剖取中肠,放在 1.5 mL 的无菌 EP 管中。研究同品系内个体之间中肠菌群差异时,每头棉铃虫中肠作为一个样品,敏感/抗性的分别取 10 头;研究抗性、敏感棉铃虫之间中肠菌群差异时,10 头棉铃虫的中肠混合作为一个样品,标记为 SM 及 RM。用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取基因组 DNA。

1.3 PCR 扩增 16S rDNA 全长及 V3 区

16S rDNA V3 区扩增所用引物为 343f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 534 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[21],在正向引物的 5' 端添加“GC-clamp” (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGCGCGGGCGGGGCCCCGGGG-3'),目的是为了阻止 PCR 产物在变性梯度凝胶电泳中完全解链。全长引物为 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') 和 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')^[22]。25 μL 的 PCR 反应体系为: DNA 模板 0.5 μL, 引物 (10 μmol/L) 各为 0.5 μL, *Taq* Plus 聚合酶 1 U, 10 × *Taq* Plus Buffer 为 2.5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 为 0.5 μL, 灭菌的去离子水补足 25 μL。每个样品同时进行 3 个反应重复。

V3 区 PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 其后的 19 个循环,每两个循环退火温度降低 1℃,其它条件不变;最后 15 个循环退火温度为 55℃,其它条件不变; 72℃ 延伸 10 min。全长 PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 1.5 min; 95℃ 0.5 min, 60℃ 0.5 min, 72℃ 3 min, 循环 5 次; 95℃ 0.5 min, 55℃ 0.5 min, 72℃ 3 min, 循环 5 次; 95℃ 0.5 min, 50℃ 0.5 min, 72℃ 3 min, 循环 20 次; 72℃ 延伸 10 min。

为了去除 PCR 过程中产生的异源双链,将 PCR 产物作为模板进行 Reconditioning PCR,反应程序为: 95℃ 预变性 1 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min 循环 5 次, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 AxyGEN DNA Gel Extraction Kit 回收。

1.4 16S rDNA 文库构建及 OTUs 分型

2 个品系 16S rDNA 全长扩增产物连接 pMD19-T 载体,同时做 3 个平行。将 3 个平行的连接产物混合后,取 5 μL 转化到 DH5α 感受态细胞,在含有氨苄抗性、IPTG 及 X-gal LB 平板上培养。从 2 个文库中分别挑取 96 个白斑,用 M13 引物进行 PCR 鉴定。取 5 μL PCR 产物,用 *Alu* I 和 *Sac* I 在 37℃ 酶切 4 h,酶切产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。根据酶切图谱对每个文库中所有的阳性克隆进行分型,每

个类型即为一个操作单元 (Operational taxonomic unit, OTU)^[23]。属于同一个 OTU 的克隆即使不是完全一样,也在系统分类学上非常接近^[24],所以每个 OTUs 挑一个阳性克隆作为代表进行测序分析;每个处理重复 3 次。

1.5 克隆文库的评估及序列分析

运用 CHECK _ CHIMERA 程序在 RDP (Ribosomal Database Project) 在线数据库 (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgi/chimera.cgi>) 进行嵌合体检验。

用 C 值 (Coverage)^[23] 估计所建克隆文库对样品中微生物多样性的体现, C 值计算公式为: $C = 1 - n1/N$, 其中 $n1$ 为文库中仅出现一次的克隆的数量, N 为所分析的克隆总数。理论上, C 值为 100% 时可以代表样品中的所有微生物种类, 当库容含量

越高,说明文库的覆盖率越高。

1.6 细菌群落组成差异 PCR 验证

从 16S rDNA 文库分析结果来看,在劣势菌的组成中,敏感品系和抗性品系棉铃虫肠道菌群组成存在差异。在抗性品系中,建库分析中检测到了两种不可培养的细菌,与 NCBI 中序列号分别为 EU535654 和 AB486727 相似性最高,以及产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) 和不可培养的五色杆菌 (*Uncultured Achromobacter* sp.), 这些细菌在敏感品系样品中并未被检测到。根据设计的特异性引物,以 RM 为模板,PCR 扩增产物为阳性对照,来检测敏感品系中是否能扩增出这几种细菌。通过同样的方法,也检测了建库时只在敏感品系棉铃虫肠道菌群中出现的细菌是否也存在抗性品系虫体中。根据细菌序列,共设计了 8 对特异性引物,如表 1。

表 1 群落组成差异验证引物及序列

Table 1 The primers and sequences of PCR verification

Primers	Sequence (5'→3')	Length/bp	Target bacteria
Bac-F	AGAACCTTACCTGGTCTTGACATCC	536	<i>Uncultured Bacillus</i>
Bac-R	GGCTACCTTGTTACGACTTCACCC		
Alca-F	GAGTTTGATCCTGGCTTAGATTGAATG	1523	<i>Alcaligenes</i> sp.
Alca-R	TAAGGAGGTGATCCAGCCGC		
Ach-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAA	1492	<i>Uncultured Achromobacter</i>
Ach-R	CGGCTACCTTGTTACGACTTCACC		
Ste-F	TGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTG	1521	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Ste-R	CGCACCTTCGGATACGGCTA		
U06-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAA	1459	Uncultured bacterium (FJ155006)
U06-R	GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCC		
U27-F	GGAGAATAAGTTGATGGTAACTGATACTGT	1363	Uncultured bacterium (AB486727)
U27-R	CGGTTAAGTCACCGGCTTCG		
U54-F	CCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA	1519	Uncultured bacterium (EU535654)
U54-R	GCCCTTTACGGTTACCTTGTTACGAC		
U75-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAA	1388	Uncultured bacterium (FJ707375)
U75-R	AAGGCCCGGGAACGTATTCA		

以样品基因组 SM、RM 为模板,进行 PCR 扩增,扩增体系为:模板 DNA 模板 0.5 μ L,引物 (10 μ mol/L 各为 1 μ L, *Taq* Plus 聚合酶 1 U, 10 \times *Taq* Plus Buffer 为 5 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 为 1 μ L, 灭菌的去离子水补足 50 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 循环 29 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 DGGE 及图谱分析

丙烯酰胺 (37.5:1) 浓度为 8.0%, 所用变性剂梯度为 32.5% - 50% (100% 的变性剂溶液包含体积分数为 40% 的甲酰胺与 7.0 mol/L 的尿素), 16S rDNA V3 区 PCR 产物上样量为 300 ng, 在 60 $^{\circ}$ C、200 V 电压下持续电泳 4 h, 然后用 SYBR Green I 染色

45 min, 拍照。

DGGE 图谱用 Quantity One 软件 (Version 4.6.6, Bio-Rad) 进行分析, 人工去除组成 < 1% 的条带。Shannon's 指数反映了群落的多样性, $H' = -\sum Pi \log Pi$, 其中 Pi 指图谱中第 i 条带的相对丰度。Similarity (Dice) Coefficient, S_D 反映不同处理组间的中肠微生物群落相似性, $S_D = 2n_{AB} / (n_A + n_B)$, 其中 n_{AB} 是 AB 两个处理组中的共有条带数目, n_A 是 A 处理组中的条带数目, n_B 是 B 处理组中的条带数目。

2 结果和分析

2.1 16S rDNA 文库的酶切分析

2 个文库各挑 96 个白斑进行菌落 PCR, 鉴定引

物为 M13, 结果显示, 抗性品系和敏感品系 16S rDNA 文库阳性克隆分别为 94 和 90, 阳性检出率分别为 98% 和 94%。阳性克隆对应的 PCR 产物经 *Alu I* 和 *Sac I* 双酶切分析, 通过对酶切图谱分析可知, 抗性品系和敏感品系出现的 OTUs 分别为 7 和 9。

Coverage C 理论上表示 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物的种类占样品中全部微生物的种类的比例。通过计算, 抗性品系 16S rDNA 文库中分析的 94 个克隆里, 只出现一次的克隆有 2 种, 库容分别为 97.9%, 敏感品系 16S rDNA 文库共分析了 88 个克隆, 只出现一次的克隆数有 3 种, 库容为 96.6%, 说明我们检出的微生物种类基本上可以反映样品的细菌群落结构。

2.2 16S rDNA 测序及序列分析

两个品系的 OTU 数共有 16 个, 抗性品系 7 个, 敏感品系 9 个, 每个 OTU 挑一个克隆进行测序, 测序结果 CHECK_CHIMERA 程序分析嵌合体。抗性品系的 9 个序列中有两个是嵌合体, 在后续的分析中去除, 剩余序列提交到 NCBI 数据库中进行比对, 结果如表 2 测序结果表明, 抗性品系序列比对结果相似性都非常高 ($\geq 99\%$), 只有一个序列比对结果相似性为 83%, 可能是一种新发现的细菌。在 94 个阳性克隆中, 丰度最高的是一种不可培养的细菌, 对应的克隆数为 53, 占文库的 56.4%, 其分类地位还未确定, 该序列与 NCBI 中登录号为 FJ795282 的序列相似性为 99%, 次优势菌群为乳杆菌目

(*Lactobacillales*) 下的肠球菌属 (*Enterococcus* sp.), 共有 32 个克隆, 占文库的 34.0%, 包含粪肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) 和 钻黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*)。其它占少数的微生物为 β -变形杆菌 (β -*proteobacteria*), 以及另外两种不可培养的细菌, 对应的克隆数为 6、1 和 2, 分别占 6.3%, 1.1% 和 2.1%。其中 β -变形杆菌包含产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) 和不可培养的五色杆菌 (*Uncultured Achromobacter* sp.)。敏感品系中, 所有的序列比对结果相似性都很高 ($\geq 99\%$), 优势菌群占文库的 60.2%, 与 NCBI 中登录号为 FJ795216 的序列相似性为 100%, 是一种不可培养的细菌, 分类地位还不确定。次优势菌群为肠球菌 (*Enterococcus* sp.), 共有 30 个克隆, 占所分析克隆数的 34.1%。其它的还包括 γ -变形杆菌 (γ -*proteobacteria*) 和不可培养的芽孢杆菌 (*Bacillaceae*), 分别占 2.3% 和 1.1%。

从比对结果来看, 2 个品系棉铃虫的中肠菌群结构组成大体相似, 占大多数的都是一种不可培养的微生物, 次优势菌都为粪肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) 和 钻黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*)。不同的是, 在劣势菌中, 抗性品系中出现了 β -变形杆菌 (β -*proteobacteria*), 包括产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.) 和一种不可培养的五色杆菌属 (*Uncultured Achromobacter* sp.), 这两个属的细菌均与化学农药降解相关, 而在敏感品系中, 出现的却是 γ -变形杆菌 (γ -*proteobacteria*) 和不可培养的芽孢杆菌 (*Bacillaceae*)。

表 2 样品 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中序列的比对结果

Table 2 The result of 16S rDNA sequences and comparison with sequences from NCBI database

Groups	Most related sequence in NCBI	Accession number	Identity/%	Clone relative abundance	
Bt-R(94 clones)	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	DQ465365	99	16
		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	EU151766	100	16
	Unidentified	<i>Uncultured bacterium clone</i>	FJ795282	99	53
		<i>Uncultured bacterium clone</i>	EU535654	99	1
		<i>Uncultured bacterium clone</i>	AB486727	83	2
	β - <i>proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i> sp.	FJ613798	99	5
		<i>Uncultured Achromobacter</i> sp.	FJ543032	100	1
Bt-S(88 clones)	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	EF025908	99	17
		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	EU151766	99	13
	Unidentified	<i>Uncultured bacterium clone</i>	FJ795216	100	53
		<i>Uncultured bacterium clone</i>	AY959175	99	1
		<i>Uncultured bacterium clone</i>	FJ155006	99	1
	γ - <i>proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ707375	100	2
	<i>Bacillaceae</i>	<i>Uncultured Bacillus</i> sp.	EU876635	100	1

2.3 细菌群落组成差异 PCR 验证

通过设计的八对特异性引物进行 PCR 扩增发现,16S rDNA 文库分析中发现的差异菌在两个品系

虫体肠道细菌群落中都存在,结果如图 1。PCR 结果及 16S rDNA 文库分析表明,敏感品系与抗性品系棉铃虫中肠细菌群落组成相同。

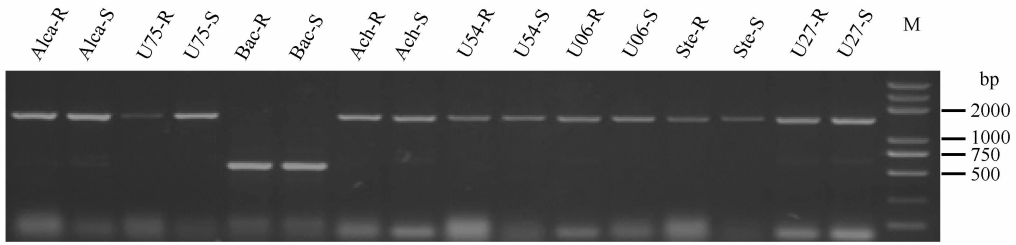


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Analysis result of agarose electrophoresis with PCR products. R: PCR products from resistant variety; S: PCR products from sensitive variety.

2.4 DGGE 及图谱分析

16S rDNA V3 区 PCR 产物 DGGE 分析表明,无论是同一品系的个体之间,还是不同品系的混合样品之间,DGGE 条带分布都很相似,在用软件统计各泳道的条带数目时,人工去除了组成小于 1% 的条带,因为用 DGGE 进行群落分析时,占群落微生物总量不足 1% 的并不能被监测到。敏感品系和抗性品系个体样品 DGGE 条带数目 N 分别为 6.1 和 5.7,多样性指数 H' 分别为 0.765 和 0.732,变异系数

分别为 5.6% 和 7.5%。对于混合样品,敏感品系和抗性品系条带数目分别 6 和 7,多样性指数分别为 0.765 和 0.830。从上述数据也可以看出,无论是同一品系还是品系间,棉铃虫中肠菌群组成差异性都很小。相似性系数 S_D 的大小,能反映不同生境群落组成的相似性程度,是群落分析中的重要指标。在本实验中,敏感品系和抗性品系棉铃虫在三龄时期,它们中肠细菌群落相似性达 92.3%,这说明两种棉铃虫中肠的菌群多样性很相似。

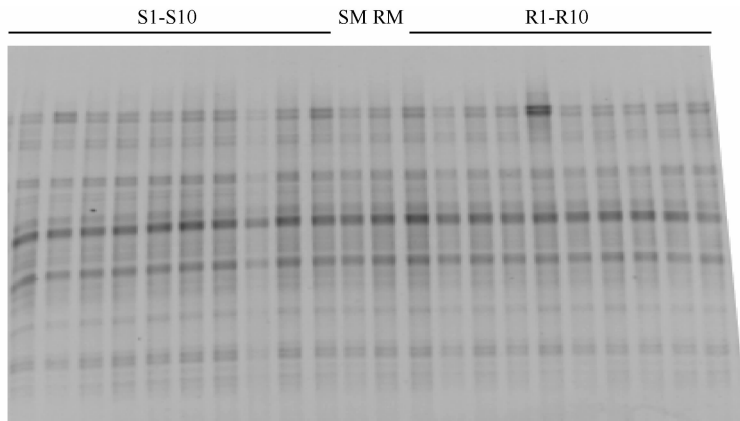


图 2 棉铃虫中肠细菌 16S rDNA V3 区的 DGGE 分析

Fig. 2 DGGE analysis of 16S rDNA V3 region from the midgut of larvae *H. armigera*. Lane 1-10: S1-S10; Lane 11: SM; Lane 12: RM; Lane 13-22: R1-R10.

表 3 基于 DGGE 图谱的抗性/敏感品系棉铃虫中肠细菌群落结构差异性分析

Table 3 Variation based on DGGE profile of midgut bacterial communities of resistant and sensitive larvae population of *H. armigera*

Items	Pool Samples		Individual Samples (n = 10)	
	Bt-S	Bt-R	Bt-S	Bt-R
H'	0.765	0.830	0.765 ± 0.043	0.732 ± 0.055
N	6	7	6.1 ± 0.6	5.7 ± 0.8
CV	-	-	5.6%	7.5%

3 讨论

棉铃虫对 Bt 的抗性问题是世界各国关注的热点问题,但至今对抗性机制并无统一认识,许多学者有不同的观点。Bt 毒蛋白与昆虫作用过程中任何一步的改变都有可能导致昆虫对 Bt 产生潜在抗性,因此昆虫对毒素的抗性机制是复杂多样的。已报道的几种主要抗性机制包括:中肠蛋白酶活化能力减弱、中肠受体蛋白的改变导致受体与毒蛋白结合能力降低、中肠上皮细胞修复速率加快、中肠免疫系统活性增强、抗氧化能力增强等^[25]。自 2006 年 Broderick 等首次报道了微生物影响 Bt 活性以来,中肠微生物与 Bt 活性的关系及中肠微生物是否参与昆虫对 Bt 产生抗性的过程,也引起很多学者的兴趣。

本实验将 DGGE 和 16S rDNA 两种技术相结合,分析了国内特有的 Bt 毒蛋白抗性棉铃虫种群中肠细菌群落结构,并与敏感种群进行了分析和比较。16S rDNA 分析结果显示,两种品系的棉铃虫中肠微生物组成非常相似,优势菌种类相同,丰度差别不大;但是在一些劣势菌上存在差别。通过特异性引物进行 PCR 验证发现,这些劣势菌在两种品系虫体中都存在,我们推测,这种差异可能是由于这些劣势菌在中肠细菌群落中所占比例很少,对 16S rDNA 文库进行 OTU 分型时很容易发生漏检而产生的;同时,本文建库时库容 C 并未达到 100% 也是导致劣势菌漏检的因素之一。为了更全面、更准确地研究微生物群落,还需要将多种技术相结合,以及引进更新的群落分析的方法,如 Miniprimer-PCR^[26]。DGGE 结果表明,两个品系中肠细菌群落多样性和丰度都有极大的相似性,相似性系数达到 92.3%。以上实验结果显示,与敏感品系棉铃虫相比,抗性品系棉铃虫中肠菌群组成并未发生显著变化,说明棉铃虫 Bt 抗性的产生与其中肠细菌群落无直接关系。

参考文献

[1] Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR and Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (3): 775-806.

[2] Peferoen M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15, 173-177.

[3] McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 1985, 229 (4079): 193-195.

[4] 梁革梅,谭维嘉,郭予元. 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性筛选及遗传方式的研究. *昆虫学报 (Acta Entomologica Sinica)*, 2000, 43(1): 57-62.

[5] Meng FX, Shen JL, Zhou WJ, Cen HM. Long - term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hüner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 2004, 60(2): 167-172.

[6] Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 1990, 83(5): 1671-1676.

[7] Shelton AM, Robertson JL, Tang JD, Perez C, Eigenbrode SD, Preisler HK, Wilsey WT, Cooley RJ. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology*, 1993, 86(3): 697-705.

[8] Janmaat AF, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings-Royal Society of London. Biological Sciences*, 2003, 270(1530): 2263-2270.

[9] 李国平. Bt 棉花种植区棉铃虫种群对 Cry1Ac 蛋白抗性频率分析. 河北农业大学硕士学位论文, 2003, 5.

[10] 傅强, 张志涛, 胡萃, 赖凤香. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. *昆虫学报 (Acta Entomologica Sinica)*, 2001, 44(4): 534-540.

[11] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 陶林勇. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用. *昆虫学报 (Acta Entomologica Sinica)*, 2001, 44(2): 193-197.

[12] Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. Exploitation of gut bacteria in the locust. *Nature*, 2000, 403: 851-852.

[13] Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92 (4): 759-763.

[14] Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52(6): 593-601.

[15] Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*, 2006, 103(41): 15196-15199.

[16] Broderick NA, Robinson CJ, McMahon MD, Holt J, Handelsman J, Raffa K. Contribution of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology*, 2009, 7: 11-19.

[17] Raymond B, Johnston PR, Wright DJ, Elis RJ, Crickmore N, Bonsall MB. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(10), 2556-2563.

- [18] Liang GM, Wu KM, Yu HK, Li KK, Feng X, Guo YY. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 97(2): 142-149.
- [19] 姜玮瑜, 代平礼, 张永军, 周婷, 林毅, 束长龙, 张杰. 转 Bt-cry1Ac 基因棉花对意大利蜜蜂肠道细菌群落的影响. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(2): 176-186.
- [20] 梁革梅, 谭维佳. 人工饲养棉铃虫技术的改进. *植物保护 (Plant Protection)*, 1999, 25(2): 15-17.
- [21] Nakatsu CH, Torsvik V, Ovreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64: 1382-1388.
- [22] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [23] Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Kari DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes; Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2501-2507.
- [24] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264.
- [25] Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Gould F, Tabashnik BE. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 95(3): 192-197.
- [26] Isenbarger TA, Finney M, Ríos-Velázquez C, Handelsman J, Ruvkun G. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3): 840-849.

Comparison of midgut bacterial community between Bt-resistant and sensitive *Helicoverpa armigera*

Weiyu Jiang^{1,2}, Gemei Liang², Yi Lin¹, Changlong Shu², Fuping Song², Jie Zhang^{2*}

(¹ College of Chemical Engineering; Huaqiao University; Xiamen 361021, China)

(² State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection; Chinese Academy of Agricultural Sciences; Beijing 100193, China)

Abstract: [**Objective**] To investigate the midgut bacterial community of sensitive and resistant *Helicoverpa armigera* for the emergence of resistance to *Bacillus thuringiensis*. [**Methods**] Two culture-independent techniques (16S rDNA library and DGGE) were introduced. The genomic DNA of midgut bacteria was extracted. The full length gene of 16S rDNA was amplified by PCR and then cloned. The 16S rDNA library was analyzed with *Alu* I and *Sac* I. The V3 region of 16S rDNA was amplified by PCR. The intrapopulation variation and variation between resistant and sensitive *Helicoverpa armigera* were assayed by DGGE. [**Results**] Analysis of 16S rDNA library showed similar patterns of midgut bacterial structure and diversity in terms of the dominant bacteria, but the inferior bacteria were significant different. The resistant population harbored abundant phylotypes belonging to uncultured bacterium (56.4%), *Enterococcus gallinarum* (17.0%) and *Enterococcus casseliflavus* (17.0%). For the sensitive population, the dominant bacteria were uncultured bacterium (60.2%), *Enterococcus casseliflavus* (14.7%) and *Enterococcus gallinarum* (19.3%). The divergence of midgut bacteria community between resistant and sensitive populations detected by 16S rDNA library analysis was verified by PCR with specific primers, and the result showed that all those inferior bacteria presented in both varieties. DGGE profile revealed that the similarity of the two varieties was 92.3%. [**Conclusion**] The midgut bacterial community of resistant and sensitive *H. armigera* was similar, which had no direct effect on Bt-resistance of *H. armigera*.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; bacterial community; 16S rDNA; DGGE; resistance; *Bacillus thuringiensis*

(本文责编: 张晓丽)