



押玉柯, 夏敏, 李军, 吴少英. 红火蚁三龄、四龄幼虫肠道菌菌群多样性分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 420–429.

红火蚁三龄、四龄幼虫肠道菌菌群多样性分析

押玉柯¹, 夏敏^{1*}, 李军^{2*}, 吴少英³

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳 473061;

2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260;

3. 海南大学植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 昆虫体内细菌的多样性对昆虫的消化、营养的吸收、生长发育繁殖具有至关重要的作用。本研究利用 16S rRNA 基因序列, 构建内生菌 16S rRNA 克隆文库, 探明红火蚁 3 龄幼虫和 4 龄幼虫种群体内微生物菌群结构并加以对比, 采用 Miseq 高通量测序的方法揭示红火蚁 3 龄幼虫与 4 龄幼虫肠道菌的相似性和差异性。结果表明: 红火蚁高龄幼虫的两个不同发育阶段肠道菌菌群的结构及组成存在一定的差异性。3 龄幼虫肠道菌的物种丰富度和物种多样性都低于 4 龄幼虫。红火蚁 3 龄、4 龄幼虫体内共有 183 个 OTU, 归属于 15 个门、24 个纲、56 个目、101 个科、151 个属, 其中 3 龄幼虫肠道微生物的 OTU 数目有 51 个, 其优势菌群为支原菌属, 比例达到 95.11%; 4 龄幼虫肠道微生物的 OTU 数目有 170 个, 其优势菌群为变形菌门的 7 个属, 比例达到 93.78%, 其中优势菌属为肠杆菌属, 比例达到 37.10%。本研究分析了红火蚁高龄幼虫肠道菌的细菌多样性及 3 龄幼虫与 4 龄幼虫两个阶段肠道菌群落的群落结构组成差异, 为进一步明确红火蚁高龄幼虫肠道菌生理功能和生态学意义具有重要的参考价值。

关键词: 红火蚁; 幼虫; 细菌多样性; Miseq 高通量测序; 16S rRNA

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 02-0420-10

Diversity analysis of intestinal flora in the third and fourth-instar larvae of *Solenopsis invicta*

YA Yu-Ke¹, XIA Min^{1*}, LI Jun^{2*}, WU Shao-Ying³ (1. School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan Province, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China; 3. College of Plant Protection, Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests (Hainan University), Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Abstract: The diverse bacteria in insects play important roles in digestion, nutrition absorption, growth and reproduction in insects. In this study, 16S rRNA gene sequences were used to construct a 16S rRNA clone library of endophytic bacteria. The microbial community structures of the third and fourth-instar larvae of *Solenopsis invicta* were determined and compared. The similarities and differences between the microbial communities of the third and fourth-instar larvae of *S. invicta* were revealed by high-throughput

基金项目: 广东省科学院建设国内一流研究机构行动专项资金 (2020GDASYL-20200301003); 广东省科技计划 (2017A020219002, 2019B030316018); 广东省科学院发展专项资金 (2018GDASCX-0107, 2019GDASYL-0103064)

作者简介: 押玉柯, 女, 1990 年生, 硕士研究生, 研究方向为环境保护与生态修复, E-mail: ya930103@163.com

* 共同通讯作者 Author for correspondence: 夏敏, 男, 学士, 教授, 主要从事生物质能源研究, E-mail: xiamin@nynu.edu.cn; 李军, 男, 博士, 研究员, 主要从事入侵生物学研究, E-mail: junl@giabr.gd.cn

收稿日期 Received: 2020-10-29; **接受日期** Accepted: 2020-12-17

MiSeq sequencing. The results showed that there were some differences in the structure and composition of intestinal bacteria in the two different stages of development of *S. invicta* senior larvae. The species abundance and species diversity of the third instar larvae samples were lower than the fourth instar larvae. A total of 183 OTUs were obtained from the third and fourth-instar larvae of *S. invicta* belonging to 15 phyla, 24 classes, 56 orders, 101 families and 151 genera. Among them, 51 OTUs were obtained from the third-instar larvae, and 170 OTUs were obtained from the fourth-instar larvae. The dominant microbial taxon of the third-instar larvae was the genus *Mycoplasma*, which accounts for 95.11%. The dominant microbial taxon of the fourth-instar larvae of *S. invicta* was 7 genera of the *Proteobacteria*, with a proportion of 93.78%, of which the dominant bacteria was *Enterobacter*, with a proportion of 37.10%. This study analyzed the bacterial diversity of the intestinal bacteria in the advanced instar larvae of *S. invicta* and the difference in the composition of the intestinal flora of the third and fourth-instar larvae in order to further clarify the physiological function and ecology of the intestinal bacteria. The academic significance had important reference value.

Key words: *Solenopsis invicta*; larvae; bacterial diversity; MiSeq high-throughput sequencing; 16S rRNA

红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 属于膜翅目 Hymenoptera 蚁科 Formicidae 切叶蚁亚科 Myrmicinae 火蚁属 *Solenopsis* (Vinson, 1997), 是一种原产于南美洲巴拉那河流域的危险性害虫。2003 年 10 月在台湾发现有红火蚁危害, 2004 年 9 月在中国大陆广东吴川市首次发现 (曾玲等, 2005)。作为一种新的入侵害虫, 红火蚁蚁巢一旦遭到破坏, 会迅速爬出巢穴, 叮咬破坏者, 严重威胁公共安全 (Tschinkel, 1993)。人体被红火蚁叮咬后有如针刺般的疼痛, 过敏者会有脓包、瘙痒等症状, 严重的可能会出现过敏性休克甚至死亡 (James *et al.*, 1976)。同时, 红火蚁也会危害当地农作物, 破坏本地物种的生物多样性。通过取食作物的种子、果实、幼芽、幼茎及根系, 造成农作物大面积减产 (Steward and Vinson, 1991)。通过捕食、竞争空间等途径降低入侵地生物尤其本地蚂蚁的物种丰富度和生物多样性 (Porter and Savignano, 1990; Pennisi, 2000; 杨伟东等, 2005; 沈鹏等, 2007)。

昆虫体内存在着多种内生菌, 并且其体内的微生物具有丰富的生物多样性。内生菌分布于昆虫的胸腺、食道、肠道、唾液腺、马氏管等组织部位, 但主要分布在肠道和体液中 (薛宝燕等, 2004; 郭军等, 2015)。昆虫的种类不同, 内生菌的分布也会有差异, 内生菌的分布与生活定殖的环境也有很大的关系, 但主要受培育的影响 (谭周进等, 2005)。昆虫消化系统伴随着宿主昆虫的取食、消化、排泄等生理活动, 其中共生菌非常丰富, 一般认为这些共生菌是宿主正常生长所必需的 (彩万志, 1990)。肠道微生物主要消化吸收

营养物质, 甚至有些肠道微生物还能够合成生长所必需的营养物质。张焱等 (2016) 发现昆虫的内生菌和线粒体一样, 由宿主通过垂直传播的方式传递给后代, 也可以在物种内和物种间进行水平传播, 有研究结果显示, 寄主内共生菌可以通过昆虫天敌寄生蜂进行水平传播 (郑庆伟, 2015)。昆虫的内生菌分为原生内生菌和次生内生菌 (谭周进, 2005; 黄旭, 2016)。原生内生菌一般依靠垂直传递 (徐红星等, 2009), 主要分布在特殊细胞内, 为宿主昆虫生长繁殖所必需; 次生内生菌在宿主内既可垂直传播也可水平传播 (Baumann, 2005; Oliveret *et al.*, 2010), 不是昆虫宿主生长所必需的。在自然界进化过程中, 内生菌与宿主昆虫互利共生 (Wilkinson, 1998; Oliver *et al.*, 2010)。内生菌在宿主消化、生长繁殖和行为中起着重要的作用 (杨义婷等, 2014), 昆虫体内的某些共生菌能够为宿主提供食物中所缺乏的主要营养物质, 消化食物以调节营养平衡 (王荫长, 1994; 吕仲贤等, 2001)。

以昆虫为宿主的内生菌能够在宿主体内生长、繁殖, 从而昆虫共生菌也会因昆虫定殖环境的改变发生改变。将昆虫体内内生菌分离出来的方法有传统分离法和分子生物学的方法。传统分离法主要是通过划线的方法分离可培养的微生物, 而环境中大部分微生物是不可培养的 (Han *et al.*, 2015), 因此可通过分子生物学的方法获得昆虫体内内生菌的一些数据。以分子生物学作为手段, 昆虫共生菌的基因组 DNA 做模板, 将 PCR 扩增序列在 NCBI 数据库中比对, 得到其微生物数量、种

属、区系组成及群落组成以及微生物与周围自然条件相互影响的关系体系 (Amann *et al.*, 1995)。16S rRNA 分为可变区和保守区, 每一种细菌的保守区都相同, 可以反映物种之间的亲缘关系; 而可变区因细菌的种类而有差异, 可通过可变区了解物种之间的差异。有研究表明通过构建白蚁肠道 16S rDNA 文库, 研究结果发现其肠道共生菌物种具有丰富性、多样性, 其中有厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、螺旋体门等细菌 (Zeng *et al.*, 2015)。因此, 通过 16S rDNA Miseq 高通量测序技术 (high throughput sequencing) (Koboldt *et al.*, 2013) 的方法分析研究昆虫体内微生物的多样性, 为进一步明确昆虫内生菌生理功能和生态学意义具有重要的参考价值。

红火蚁 1 龄、2 龄、3 龄幼虫咽部能过滤掉直径大于 $0.88\ \mu\text{m}$ 的食物, 只能消化育幼蚁反刍的液体食物。而 4 龄幼虫能够取食直径为 $45.8\ \mu\text{m}$, 甚至较大的固体颗粒 (Michael Glancey *et al.*, 1981)。固体食物必须经过 4 龄幼虫消化后, 再通过育幼蚁交哺饲喂给蚁后及低龄幼虫, 从而为整个蚁群提供蛋白质、油脂类及碳水化合物等营养物质, 进而维持整个蚁群的正常发育 (Tschinkel, 1995; Vinson, 1997)。因此在整个蚁巢中, 4 龄幼虫对红火蚁群落的生存尤为重要。

目前国内对红火蚁幼虫肠道菌菌群的研究较少, 而国外早有研究发现红火蚁 4 龄幼虫的中肠是封闭的, 在蛹期之前会排尽肠道内容物 (Petrulia and Vinson, 1980), 但是对红火蚁中肠可培养细菌知之甚少, 前人的研究主要集中在尚未培养的专性共生体上 (Peloquin *et al.*, 2001), 直到 2003 年有研究者才证实了红火蚁 4 龄幼虫中肠道确实有细菌 (Peloquin and Greenberg, 2003)。Medina 等尝试使用 SEM 和 TEM 发现红火蚁的肠道共生菌 (Medina *et al.*, 2007)。Lee 等分别取不同的 3 个地点的红火蚁的 4 龄幼虫测其 16S rRNA 基因, 发现 3 个地点的红火蚁 4 龄幼虫内生菌并没有紧密的关系, 证实红火蚁幼虫内生菌菌群由所吃的食物决定 (Lee *et al.*, 2008)。

因为昆虫肠道内共生菌通常处于平衡状态, 并受其昆虫宿主的控制, 但如果被人为干扰, 就会破坏这一平衡从而对宿主有机体致病。该研究的最初目的就是找到 4 龄幼虫的某一肠道可培养共生菌, 人为干扰其表达从而达到生物防治的目的。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用红火蚁来自广州番禺, 在野外挖取整个蚁巢装入塑料桶 ($35.5\ \text{cm} \times 34.8\ \text{cm}$) 中带回实验室在控制条件下 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, RH $70\% \pm 5\%$, L:D = 8:16) 饲养, 塑料桶内壁涂抹福隆 (AGC Chemicals Europe, Ltd., Thornton-Cleveleys, Lancashire, UK) 以防蚂蚁逃逸。所有的蚁巢都由大量工蚁、有翅蚁、各阶段的幼虫及蛹组成, 饲喂方法参考 Li 等方法 (Li *et al.*, 2016), 待蚁群稳定后将红火蚁利用滴水法 (吕利华等, 2006) 从土壤中分离供试验所需幼虫。分离出来的红火蚁放入底部铺有 1 cm 后石膏的塑料盒 ($28\ \text{cm} \times 17\ \text{cm} \times 18\ \text{cm}$) 中备用, 塑料盒的周围涂有福隆。

1.2 样品总 DNA 提取

在体视显微镜下分别挑选出 3 龄幼虫和 4 龄幼虫各 20 头, 用液氮速冻, 放于 -80°C 冰箱备用。经体表消毒后, 按照 OMEGA Insect DNA Isolation Kit (OMEGA, USA) 的说明书提取样品中的总 DNA。

1.3 高通量测序

采用细菌通用引物 338 F 和 806 R 对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行 PCR 扩增, 扩增的反应条件为: 94°C , 5 min; $30 \times (94^\circ\text{C}, 30\ \text{s}; 60^\circ\text{C}, 30\ \text{s}; 72^\circ\text{C}, 1\ \text{min})$; 72°C , 10 min。扩增体系 ($20\ \mu\text{L}$) 为: $2 \times \text{Taq Master Mix}$ (Dye Plus) $10\ \mu\text{L}$ 、Forward Primer $1\ \mu\text{L}$ 、Reverse Primer $1\ \mu\text{L}$ 、DNA 模板 $10\ \text{ng}$ (Long *et al.*, 2010)。采用上海美吉生物医药科技有限公司的 MiSeq PE300 测序仪进行序列测定。

1.4 数据分析

Illumina MiSeq 得到的数据是双端序列, 首先根据 PE 读长之间的部分重叠关系, 将成对的读长拼接成一条序列, 同时对读长的质量和拼接的效果进行质控过滤, 根据序列首尾两端的 barcode 和 primer 序列区分样品得到的有序序列, 并校正序列方向。采用软件 Trimmomatic 和 FLASH 对数据进行去杂 (Chen *et al.*, 2016)。通过 Usearch 软件平台 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse>) 对 OTU (Ye *et al.*, 2017) 进行聚类, 获得 OTU 的代表序列。将所有优化序列至 OTU 的代表序列, 选出与 OTU 代表序列相似性大于等于 97% 的序列,

生成 OTU 表格。为了得到每一个 OTU 对应的物种分类信息，通过贝叶斯算法对相似水平的 OTU 高于 97% 的代表序列进行分类学分析，并在各个分类学水平上分别统计各样本的群落组成。比对分类采用 Silva (Release 128 <http://www.arb-silva.de>) 数据库 (Yun *et al.*, 2014)。通过 Alpha 多样性指数统计分析研究微生物群落的差异。基于各分类学水平样本序列数统计表，利用 R 语言工具作图分析不同样本在各分类水平 (如域、界、门、纲、目、科、属、种、OTU 等) 上的群落结构组成差异。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

3 龄幼虫和 4 龄幼虫的样品序列经拼接、质控和过滤后分别得到 44 390 和 51 559 条序列，将序列相似性为 97% 的归为 1 个 OTU，2 个样品中总 OTU 数目为 183，3 龄幼虫的 OTU 数目为 51，4 龄幼虫的 OTU 数目为 170。

2.2 稀释曲线分析

稀释曲线 (Rarefaction curve) 可以反应不同样品的测序深度。它也可以用来比较不同样本中物种的丰富度、均一性。随着随机抽取测序数据量的增加，稀释曲线逐渐趋于平缓，说明测序结果比较合理，更多的数据量只会产生极少新的 OTU。两样品的稀释曲线随着测序深度的增加逐渐趋于平缓，表明测序覆盖率较高 (图 1)。

2.3 3 龄幼虫和 4 龄幼虫的 Venn 图分析

3 龄幼虫和 4 龄幼虫样品共有的 OTU 数目为 38，而 3 龄幼虫样品独有的 OTU 数目为 13，4 龄幼虫样品独有的 OTU 为 132。两样品中的细菌只有少部分相似，4 龄幼虫样品中的细菌种类比 3 龄幼虫样品中的细菌种类更丰富；其中 3 龄幼虫和 4 龄幼虫样品的细菌种类分别占两样本所有细菌种类的 27.87%、92.90% (图 2)。

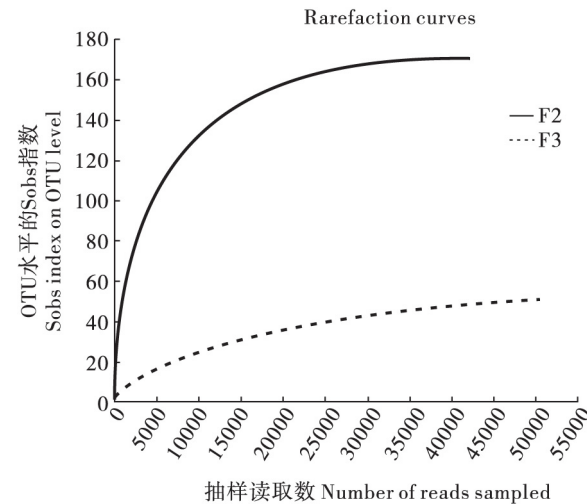


图 1 样品稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of all samples

注：F2 为 4 龄幼虫，F3 为 3 龄幼虫。下同。Note: F2 was fourth instar larvae, F3 was third instar larvae. Same below.

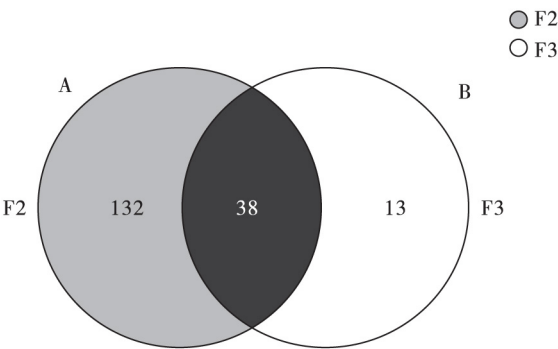


图 2 细菌物种组成的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of bacterial species composition

注：A，4 龄幼虫样品 F2；B，3 龄幼虫样品 F3。Note: A, Fourth instar larvae sample F2; B, Third instar larvae sample F3.

2.4 3 龄幼虫和 4 龄幼虫门水平的 Alpha 多样性分析

本次各样本测序结果覆盖率均大于 99.95%。4 龄幼虫的物种丰度和物种多样性显著高于 3 龄幼虫 (表 1)。

表 1 样品多样性指数表
Table 1 Sample diversity index table

龄期 Instar	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage
4 龄幼虫 4 th instar larvae	0.3173	0.8806	14	14	1
3 龄幼虫 3 rd instar larvae	0.2046	0.9066	9.6875	9	0.9995

2.5 3 龄幼虫和4 龄幼虫的物种组成分析

高通量测序结果表明,在门、纲、目、科、属5 个细菌分类学水平上,3 龄幼虫比4 龄幼虫物种丰富度低(表2)。

2.5.1 门水平样品物种分布

3 龄幼虫主要由9 个门组成,包括软壁菌门 *Tenericutes* (95.11%)、变形菌门 *Proteobacteria* (4.75%) 等,其优势种群为软壁菌门(图3)。4 龄幼虫主要由14 个门组成,包括变形菌门 *Proteobacteria* (93.78%)、放线菌门 *Actinobacteria* (2.08%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (1.93%)、厚壁菌门 *Firmicutes* (1.85%) 等。其优势种群为变形

菌门、放线菌门和拟杆菌门(图3)。而2 个龄期共有的是硝化螺旋菌门 *Nitrospirae*,由于占有的比例很低,被归为 *others*。

表2 样品在各分类水平的物种分布

Table 2 Species distribution of samples at various classification levels

龄期 Instar	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
4 龄幼虫 4 th instar larvae	14	22	51	94	139
3 龄幼虫 3 rd instar larvae	9	11	23	32	44

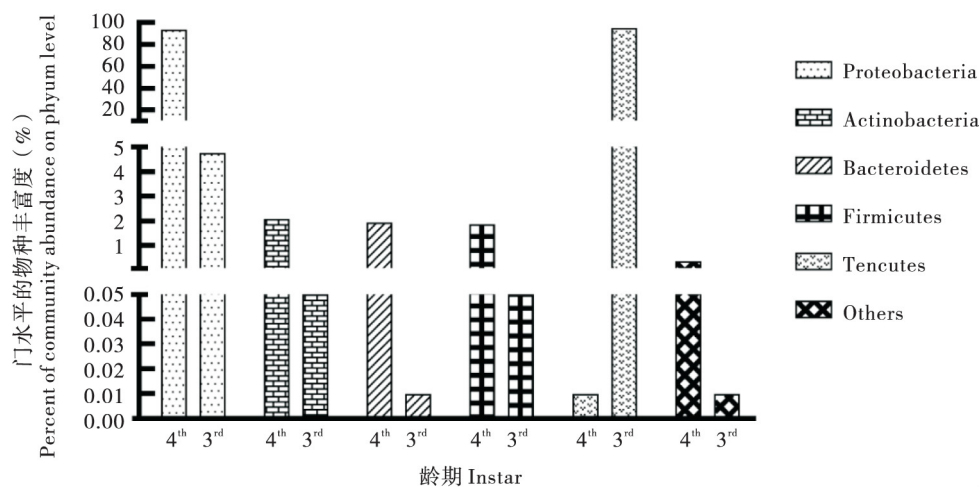


图3 不同龄期门水平物种分布

Fig. 3 Species distribution at phylum level in different instar

2.5.2 纲水平样品物种分布

3 龄幼虫主要由11 个纲组成,包括柔膜菌纲 *Mollicutes* (95.11%)、 γ -变形菌纲 *Gamma Proteobacteria* (0.27%)、 α -变形菌纲 *Alpha Proteobacteria* 等。其优势菌群为柔膜菌纲(图4)。4 龄幼虫主要由22 个纲组成,包括 γ -变形菌纲 *Gamma Proteobacteria* (92.58%)、 α -变形菌纲 *Alpha Proteobacteria* (1.16%)、放线菌纲 *Actinobacteria* (2.08%)、拟杆菌纲 *Bacteroidia* (1.93%) 等。其优势菌群为 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲和放线菌纲(图4)。

2.5.3 目水平样品物种分布

3 龄幼虫主要由23 个目组成,包括虫原体目 *Entomoplasmatales* (95.11%)、根瘤菌目 *Rhizobiales* (4.46%) 等。其优势菌群为虫原体目(图5)。4 龄幼虫主要由51 个目组成,包括肠杆菌目 *Enterobacteriales* (77.88%)、假单胞目

Pseudomonadales (7.27%)、黄单胞菌目 *Xanthomonadales* (6.09%)、根瘤菌目 *Rhizobiales* (0.71%)、*Flavobacteriales* (1.54%)、 β -变形杆菌目 (1.08%) 等。其优势菌群为肠杆菌目、假单胞目和黄单胞菌目(图5)。

2.5.4 科水平样品物种分布

3 龄幼虫主要由32 个科组成,包括虫原体科 *Entomoplasmataceae* (95.11%)、根瘤菌科 *Rhizobiaceae* (4.46%) 等。其优势菌群为虫原体科(图6)。4 龄幼虫主要由94 个科组成,包括肠杆菌科 *Enterobacteriaceae* (77.88%)、莫拉菌科 *Moraxellaceae* (6.62%)、黄单胞菌科 *Xanthomonadaceae* (6.09%)、*Weeksellaceae* (1.53%)、伯克氏菌科 *Burkholderiaceae* (1.07%)。其优势菌群为肠杆菌科、莫拉菌科和黄单胞菌科(图6)。

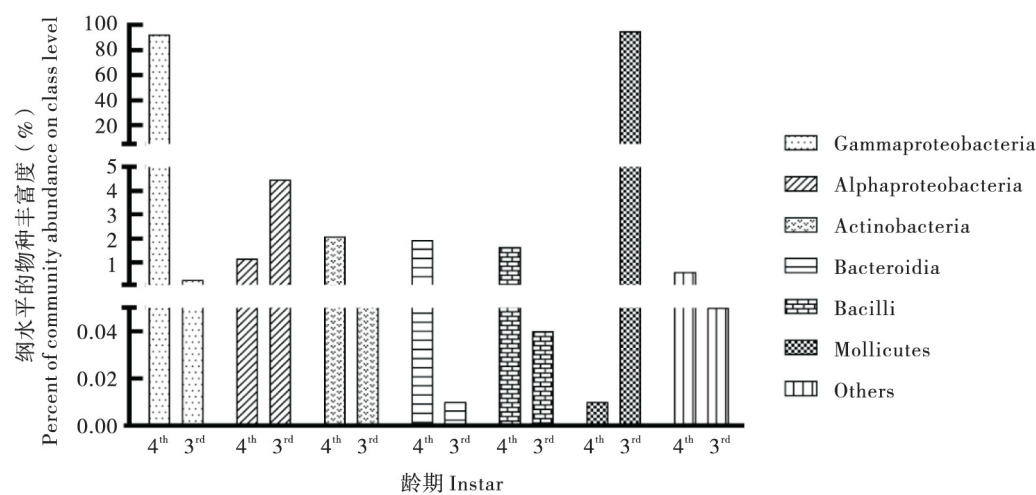


图 4 不同龄期纲水平物种分布

Fig. 4 Species distribution at class level in different instar

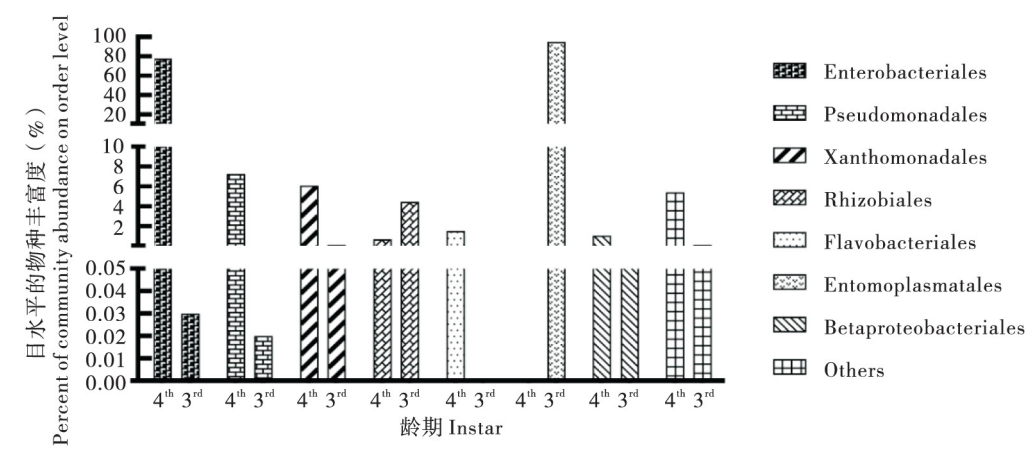


图 5 不同龄期目水平物种分布

Fig. 5 Species distribution at order level in different instar

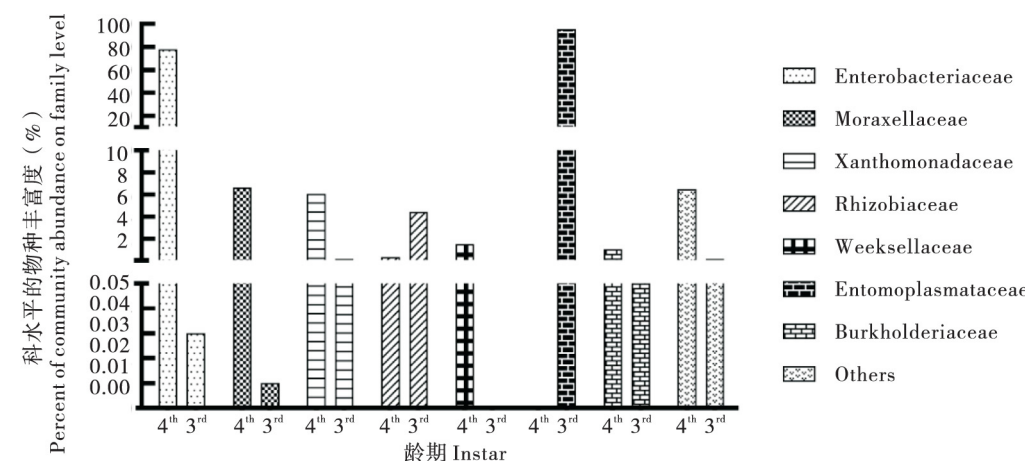


图 6 不同龄期科水平物种分布

Fig. 6 Species distribution at family level in different instar

2.5.5 属水平样品物种分布

3 龄幼虫主要由 44 个属组成, 包括支原菌属 *Mycoplasma* (95.11%)、中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* (4.45%) 等。其优势菌群为支原菌属 (图 7)。4 龄幼虫主要由 139 个属组成, 包括肠杆菌属 *Enterobacter* (37.10%)、预研菌属

Yokenella (26.79%)、不动杆菌属 *Acinetobacter* (6.62%)、沙雷氏菌属 *Serratia* (6.36%)、泛菌属 *Pantoea* (6.35%)、*Vulcaniibacterium* (5.48%) 等。其优势菌群为肠杆菌属、预研菌属、不动杆菌属和沙雷氏菌属 (图 7)。

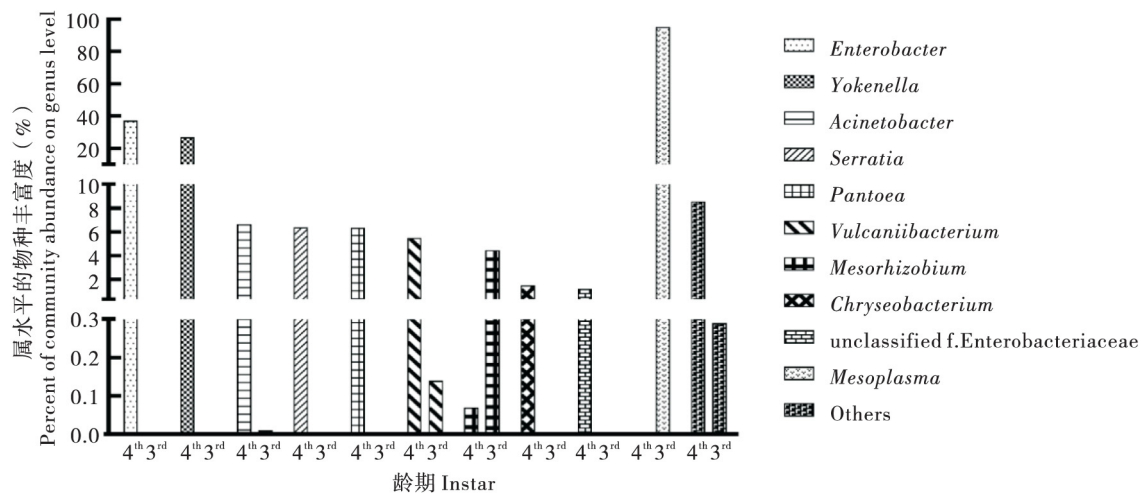


图 7 不同龄期属水平物种分布

Fig. 7 Species distribution at genus level in different instar

3 结论与讨论

本研究采用 16S rDNA V3 + V4 高变区的 Illumina Miseq 高通量测序法对红火蚁 3 龄幼虫和 4 龄幼虫肠道内微生物多样性进行系统分析, 初步揭示了红火蚁 3 龄幼虫与 4 龄幼虫肠道内微生物群落结构组成的差异性。

但是, Illumina Miseq 高通量测序只能将红火蚁 3 龄和 4 龄幼虫的肠道菌注释到属水平上, 主要是由于高通量测序可同时在数百万个点上读长, 不可能对 16S rRNA 的所有可变区进行测序, 通常只选择在 450 ~ 550 bp 之间作为一个测序区域, 因此导致后续统计数据分析时, 对物种注释的分辨率降低。

通过 Venn 图分析、Alpha 多样性分析及细菌多样性分析等分析方法, 对红火蚁的 3 龄幼虫和 4 龄幼虫 2 个阶段的肠道细菌群落差异性分析, 结果表明红火蚁幼虫 2 个不同发育阶段肠道菌群的分布存在较大的差异性。红火蚁 3 龄、4 龄幼虫肠道菌群包括 183 个 OTU, 归属于 15 个门、24 个纲、56 个目、101 个科、151 个属, 其中 3 龄

幼虫肠道内微生物的 OUT 数目只有 51 个, 而 4 龄幼虫肠道内微生物的 OUT 数目有 170 个, 该结果表明 4 龄幼虫肠道内微生物的物种多样性及物种丰富度高于 3 龄幼虫, 引起该差异的主要原因可能是 4 龄幼虫是整个蚁巢蛋白质及能量的主要供给者, 4 龄幼虫消化固体食物后反刍给保育蚁, 保育蚁再饲喂蚁后及其它蚁型 (Whitworth *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2014)。红火蚁幼虫共有 4 个龄期, 因 3 龄幼虫和 1 龄、2 龄幼虫的取食习性相同, 为了比较不同取食习性幼虫间肠道内细菌的差异, 本研究只选取 4 龄和 3 龄两个龄期的幼虫做为实验材料。而红火蚁幼虫的其它龄期及其各个发育阶段肠道微生物的差异本实验室下一步会继续研究分析。

通过 16S rDNA 高通量测序的方法研究发现, 3 龄幼虫肠道内的优势菌群为软壁菌门的支原菌属, 比例达到 95.11%, 而红火蚁 4 龄幼虫肠道内的优势菌群为变形菌门的 7 个属, 比例达到 93.78%, 其中优势菌属为肠杆菌属, 比例达到 37.10%, 有研究表明, 肠杆菌属与昆虫营养消化有密切关系。表明 2 个样本内细菌群落的差异较大。昆虫肠道菌结构组成的主要优势菌集中在变

形菌门和厚壁菌门,并且杂食性昆虫比单一食性昆虫肠道菌群丰富度更高 (Yun *et al.*, 2014)。这一结论与本文的研究结果相符,因为红火蚁 4 龄幼虫获得的食物种类远远丰富于其它虫龄,因此肠道内应具有更加丰富的菌群,从而为红火蚁的营养供给提供保证,具体每种菌的功能值得下一步研究。

许多因素可能影响肠道共生菌的存在和数量,包括饮食、年龄、疾病状态和行为 (Dillon and Dillon, 2004)。在昆虫的不同发育阶段,体内菌群的物种丰富度会有一些的差异,不同发育龄期的内生菌多样性也有所差异。在社会性昆虫中,成虫羽化后的营养和微生物演替速率可能是影响种群健康的重要变量 (Anderson *et al.*, 2011)。本研究结果表明,红火蚁 4 龄幼虫肠道菌菌群物种丰富度及多样性均大于 3 龄幼虫,其原因可能是由于红火蚁不同龄期的幼虫其在蚁巢中的分工不同而引起肠道菌菌群物种丰富度的差异;也可能是由于受宿主生存环境的影响。昆虫肠道结构影响菌群群落组成,肠道的微环境有所差异,因此不同的肠道位置具有不同的微生物。在脊椎动物中,某些微生物的定殖可以显著改变群落的组成,而群落对抑制病原体定殖的能力被认为是本地昆虫肠道微生物群最重要的功能 (Lee *et al.*, 2008)。

昆虫体内存在大量可培养与不可培养的微生物,在自然界的进化过程中微生物与寄主形成了密切的互利共生关系,在昆虫的整个生活周期中起重要的作用。Lee 等人研究发现,红火蚁肠道细菌来自于其所生存的环境,4 龄幼虫的肠道细菌存在是因为它们取食了带有细菌的食物 (Lee and Hooper-Bùi, 2012)。然而,本研究发现具有相同食物来源的 4 龄幼虫与 3 龄幼虫的微生物种类明显不同,4 龄幼虫肠道内的优势菌群为变形菌门的 7 个属,其中优势菌属为肠杆菌属,而肠杆菌属与昆虫营养消化密切相关,因此红火蚁在吸收营养时是否对自身消化有关的细菌具有一定的选择性有待于进一步验证。Whitworth 等人从 4 龄幼虫中纯化和鉴定了 4 种蛋白酶,发现卵、预蛹、蛹和成虫没有这些蛋白酶,而 1 龄、2 龄和 3 龄幼虫的酶活性明显低于 4 龄幼虫 (Whitworth *et al.*, 1998)。4 龄幼虫对红火蚁群落的生存最为重要,因为它不仅是用于消化固体食物酶的单一来源,而且是与群落其余虫态共享消化物质的独特来源 (Vinson and Sorensen, 1986)。因此这些酶很可能参与了红

火蚁群落对食物的消化,这些酶与肠杆菌的关系也值得进一步研究。有研究表明,白蚁肠道共生菌的消除,可使白蚁在短期内死亡,反映了肠道共生菌对白蚁的生命必然有着某种重要作用 (Xiang and Zhou, 2009)。也有研究表明,使用美洲大蠊喂食抗生素后,其肠道菌群被消除,导致宿主的代谢速率减慢且体重降低,说明肠道微生物能为宿主提供必要的营养物质 (Ondrejček, 2016)。本研究通过 Illumina Miseq 测序手段对红火蚁 4 龄幼虫与 3 龄幼虫 2 个阶段肠道菌菌群的群落结构组成差异进行初步分析,可为下一步研究各个龄期及蚁型的肠道内生菌菌群的差异奠定基础,最终为红火蚁的生物防治提供新的思路及方法。

参考文献 (References)

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Reviews*, 1995, 59 (1): 143–169.
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, *et al.* An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*) [J]. *Insectes Sociaux*, 2011, 58 (4): 431–444.
- Baumann P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59 (1): 155–189.
- Cai WZ. The function and evolution of symbiont in insects [J]. *Insect Knowledge*, 1990, 27 (1): 55–58. 彭万志. 昆虫体内共生物的功能及进化 [J]. *昆虫知识*, 1990, 27 (1): 55–58]
- Chen BS, Teh BS, 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.
- Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions [J]. *Annual Reviews of Entomology*, 2004, 49: 71–92.
- Guo J, Wu J, Deng XY, *et al.* Research progress on the function of insect gut flora [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 52 (6): 1345–1352. 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]
- Han D, Ha HK, Hwang CY, *et al.* Bacterial communities along stratified water columns at the Chukchi Borderland in the western Arctic Ocean [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2015, 120: 52–60.
- Huang X. Isolation, Transformation and Colonization Ability of Intestinal Symbiotic Bacteria in Rice Water Weevil [J]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. 黄旭. 稻水象甲肠道共生细菌的分离、转化及定殖能力研究 [J]. 杭州: 浙江大学, 2016]
- James FK, Pence HL, Driggers DP, *et al.* Imported fire ant hypersensitivity: Studies of human reactions to fire ant venom [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1976, 58 (1): 110–120.

- Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, *et al.* The next – generation sequencing revolution and its impact on genomics [J]. *Cell*, 2013, 155 (1): 27 – 38.
- Lee AH, Hooper-Bùi L. The origin and in situ identification of uncultured gut bacteria in fourth-instar larvae of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Sociobiology*, 2012, 59 (1): 27 – 48.
- Lee AH, Husseneder C, Hooper-Bùi L. Culture-independent identification of gut bacteria in fourth-instar red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, larvae [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98 (1): 20 – 33.
- Li J, Guo Q, Lin M, *et al.* Evaluation of a new entomopathogenic strain of beauveria bassiana and a new field delivery method against *Solenopsis invicta* [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (6): e0158325.
- Long YH, Xie L, Liu N, *et al.* Comparison of gut-associated and nest-associated microbial communities of a fungus-growing termite (*Odontotermes yunnanensis*) [J]. *Insect Science*, 2010, 17 (3): 265 – 276.
- Lv LH, Feng X, Chen HY, *et al.* Introduce the methods of field collection and laboratory feeding of red fire ants [J]. *Insect Knowledge*, 2006, 2: 265 – 267. [吕利华, 冯夏, 陈焕瑜, 等. 介绍红火蚁的野外采集和实验室饲养的方法 [J]. 昆虫知识, 2006, 43 (2): 265 – 267]
- Lv ZX, Yu XP, Chen JM, *et al.* The role of commensal bacteria in the pathogenicity change of brown planthopper [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44 (2): 197 – 204. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用 [J]. 昆虫学报, 2001, 44 (2): 197 – 204]
- Medina F, Ellis EA, Pendleton MW, *et al.* Application of SEM and TEM in microbiological studies of the red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren) midgut [J]. *Microscopy & Microanalysis*, 2007, 13 (1): 234 – 235.
- Michael Glancey B, Vander Meer RK, Glover A, *et al.* VinsonFiltration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren [J]. *Insectes Sociaux*, 1981, 28 (4): 395 – 401.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, *et al.* Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits [J]. *Annual Review of Entomology*, 2010, 55 (55): 247 – 266.
- Ondrejch A. Effect of diet and bacterial clearance on energy expenditure in the cockroach *Periplaneta americana* [R]. Columbus: The Ohio State University Denman Undergraduate Research Forum, 2016.
- Peloquin JJ, Greenberg L. Identification of midgut bacteria from fourth instar red imported fire ant larvae, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Journal of Agricultural & Urban Entomology*, 2003, 20 (3): 157 – 164.
- Pennisi E. Ecology – When fire ants move in, others leave [J]. *Science*, 2000, 289 (5477): 231.
- Petralia RS, Vinson SB. Internal anatomy of the fourth instar larva of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 1980, 9 (2): 89 – 106.
- Porter SD, Savignano DA. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community [J]. *Ecology*, 1990, 71 (6): 2095 – 2106.
- Peloquin JJ, Miller SG, Klotz SA, *et al.* Bacterial endosymbionts from the genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Sociobiology*, 2001, 38 (3): 695 – 708.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The Silva ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web – based tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (D1): D590 – D596.
- Shen P, Zhao XL, Cheng DF, *et al.* Impact of red fire ant invasion on local ant diversity [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2007, 32 (2): 93 – 97. [沈鹏, 赵秀兰, 程登发, 等. 红火蚁入侵对本地蚂蚁多样性的影响 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2007, 32 (2): 93 – 97]
- Steward JW, Vinson SB. Red imported fire ant damage to commercial cucumber and sunflower plants [J]. *The Southwest Entomologist*, 1991, 16 (2): 168 – 170.
- Tan ZJ, Xiao QM, Xie BY, *et al.* Research survey of endosymbionts in insects [J]. *Bulletin of Microbiology*, 2005, 32 (4): 140 – 143. [谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 等. 昆虫内共生菌研究概况 [J]. 微生物学通报, 2005, 32 (4): 140 – 143]
- Tschinkel WR. The fire ant (*Solenopsis invicta*): Still unvanquished rin: Mchknigh BN, Biological pollution: The control and impact of invasive exotie species [J]. *Indiana Academy of Science. Indianapolis, USA*, 1993.
- Tschinkel WR. Stimulation of fire ant queen fecundity by a highly specific brood stage [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1995, 88 (6): 876 – 882.
- Vinson SB, Sorensen AA. Imported Fire Ants: Life History and Impact. Texas, Texas Department of Agriculture [M]. 1986: 28.
- Vinson SB. Invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): Spread, biology, and impact [J]. *American Entomologist*, 1997, 43 (1): 23 – 39.
- Wang YC. Insect Physiology and Biochemistry [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1994. [王荫长. 昆虫生理生化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994]
- Whitworth ST, Blum MS, Travis J. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta* isolation and characterization of four serine endopeptidases [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (23): 14430 – 14434.
- Wilkinson TL. The elimination of intracellular microorganisms from insects: An analysis of antibiotic – treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphonpisum*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 119 (4): 871 – 881.
- Xiang H, Zhou ZH. Lignocellulolytic enzymes in termite and its symbiotic microbes [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2009, 46 (1): 32 – 40.
- Xu HX, Zheng XS, Liu SP, *et al.* The role of insect endosymbionts in insect defense [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2009, 46 (3): 350 – 354. [徐红星, 郑许松, 刘淑平, 等. 昆虫内共

- 生菌在昆虫防御中的作用 [J]. 应用昆虫学报, 2009, 46 (3): 350–354]
- Xue BY, Cheng XS, Chen SR, *et al.* Research progress of insect symbiotic bacteria [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2004, 16 (3): 189–191. 薛宝燕, 程新胜, 陈树仁, 等. 昆虫共生菌研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16 (3): 189–191]
- Yang WD, Yu DJ, Chen ZY. The impact of red fire ants on the agricultural ecological environment, society and economy [J]. *Plant Protection*, 2005, 31 (5): 75–78. 杨伟东, 余道坚, 陈志彝. 红火蚁对农业生态环境和社会、经济的影响 [J]. 植物保护, 2005, 31 (5): 75–78]
- Yang YT, Guo JY, Long CY, *et al.* Advances in the research of endosymbiont bacteria and their functions [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (1): 111–122. 杨义婷, 郭建洋, 龙楚云, 等. 昆虫内共生菌及其功能研究进展 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (1): 111–122]
- Ye J, Joseph SD, Ji M, *et al.* Chemolithotrophic processes in the bacterial communities on the surface of mineral – enriched biochars [J]. *The ISME Journal*, 2017, 11 (5): 1087–1101.
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, *et al.* Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (17): 5254–5264.
- Zeng B, Han SS, Wang P. The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9342.
- Zeng L, Lu YY, Chen ZN, *et al.* Red Fire Ant Monitoring and Prevention [M]. Guangdong: Guangdong Science and Technology Press, 2005. 曾玲, 陆永跃, 陈忠南, 等. 红火蚁检测与防治 [M]. 广东: 广东科技出版社, 2005]
- Zhang Y, Zhang YB, Zhang J, *et al.* Advances in the research of endosymbionts in the secondary sucking insects [J]. *Journal of Biosafety*, 2016, 25 (2): 92–98. 张焱, 张毅波, 张婧, 等. 刺吸式昆虫次生内共生菌的研究进展 [J]. 生物安全学报, 2016, 25 (2): 92–98]
- Zheng QW. South China Agricultural University revealed that symbiotic bacteria in insect hosts can be spread horizontally by parasitic wasps [J]. *Insecticide Market Information*, 2015, 10: 46. 郑庆伟. 华南农业大学揭示昆虫寄主内共生菌可以借助寄生蜂进行水平传播 [J]. 农药市场信息, 2015, 10: 46]