



一株对草地贪夜蛾具有胃毒活性的克雷伯氏菌分离及全基因组分析

郭 鹂^{1,2}, 任广豪^{1,2}, 刘金源^{1,2}, 钟子雯^{1,2}, 樊江斌³, 于 欢^{1,2*}

(1. 湖南农业大学, 湖南省植物病虫害生物学与控制重点实验室, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128;
3. 西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本研究从田间采集的菜青虫 *Pieris rapae* L. 中肠分离获得可培养的、菌落形态有显著差异的细菌菌落 53 个。将这些菌落接种至新鲜的 LB 培养基中培养 3 d 后, 用于浸泡人工饲料并饲喂草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Smith 2 龄幼虫, 其中 9 株对草地贪夜蛾幼虫展现出一定的胃毒活性。针对杀虫活性最高的一株——克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* A7 株进行了进一步的检测, 发现其在培养后 1 d、2 d 和 3 d 后对草地贪夜蛾 2 龄幼虫处理 96 h 的致死率分别为 $26.39\% \pm 11.98\%$ 、 $8.33\% \pm 3.73\%$ 、和 $56.25\% \pm 10.26\%$, 均显著高于对照组试虫的死亡率 ($P < 0.05$)。全基因组测序的结果表明, A7 基因组总长度为 8.55 Mb, GC 含量 51.78%, 可编码 8 148 个基因, 另含有 3 大小分别为 190 495 bp、89 806 bp 和 77 436 bp 的质粒。进一步的分析结果表明, A7 株编码的 748 种基因中, 有 214 种毒力基因的检出率在 70% 以上, 306 种毒力基因的检出率低于 50%, 其余 228 种毒力基因的检出率在 50%~70% 之间; 进一步利用 VFDB 数据库对 214 种毒力基因检出率在 70% 以上的基因进行注释, 分别注释到 13 类毒力相关基因。可以观察到 A7 在 16S rDNA 系统发育树上与其他克雷伯氏菌属 *Klebsiella* sp. 的亲缘关系。本研究报道了一种对草地贪夜蛾幼虫具有杀虫活性的克雷伯氏菌, 结合基因组学的分析, 为草地贪夜蛾的生物防治奠定了基础。

关键词: 昆虫肠道分离细菌; 草地贪夜蛾; 杀虫活性检测; 克雷伯氏菌; 细菌全基因组分析

中图分类号: Q968.1;

文献标识码: A

Isolation and whole genome analysis of a strain of *Klebsiella*

基金项目: 湖南省科技创新计划 (2023NK2015); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2022JQ-203)

作者简介: 郭鹂, 女, 硕士研究生, 研究方向为资源利用与植物保护, E-mail: 740517921@qq.com

*通讯作者 Author for correspondence: 于欢, 女, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫病毒学及昆虫生理生化, E-mail: huanyu@hunau.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-10-08; 修回日期 Revision received: 2024-12-05; 接受日期 Accepted: 2024-12-09

bacterium with gastrototoxic activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

GUO Yu^{1,2}, REN Guang-Hao^{1,2}, LIU Jin-Yuan^{1,2}, ZHONG Zi-Wen^{1,2}, FAN Jiang-Bin³, YU Huan^{1,2*} (1. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, Province, China)

Abstract: Fifty-three cultivable bacterial colonies with significant differences in colony morphology were isolated from the midguts field collected *Pieris rapae* L. in this study. After being cultured in fresh liquid LB medium for 3 days, the artificial diet dots smeared with these bacterial-containing LB medium were fed to 2nd instar *Spodoptera frugiperda* Smith larvae, 9 of the isolated bacterial colonies showed insecticidal activity. Further bioassays were conducted on the *Klebsiella pneumoniae* A7 strain, which had the highest insecticidal activity among all the tested bacterial strains. The mortality of 2nd instar *S. frugiperda* was $26.39 \pm 11.98\%$, $8.33 \pm 3.73\%$, and $56.25 \pm 10.26\%$ with the serve of A7 cultured for 1, 2, and 3 days, respectively, which were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). The results of whole genome sequencing showed that the total length of the A7 genome was 8.55 Mb, with a GC content of 51.78%, which could encode 8148 genes. A7 contains three plasmids with the sizes of 190 495 bp, 89 806 bp, and 77 436 bp, respectively. Further analysis results showed that among the 748 genes encoded by A7 strain, the detection rate of 214 virulence genes was over 70%, the detection rate of 306 virulence genes was below 50%, and the detection rate of the remaining 228 virulence genes was between 50~70%. With the detection of VFDB database, 214 virulence related genes that had detected rate of virulence genes over 70% were annotated into 13 categories. This study reports a *K. pneumoniae* bacterium with insecticidal activity against the *S. frugiperda* larvae. Combined with genomic analysis, it lays the foundation for the biological control of *S. frugiperda*.

Key words: Insect gut isolated bacteria; *Spodoptera frugiperda*; insecticidal activity bioassay; *Klebsiella pneumoniae*; bacterial genomic DNA analysis

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Smith 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种原发生于美洲的多食性害虫, 具有适生区域广、迁飞速度快、繁殖能力强等特点 (Sparks,

1979)。草地贪夜蛾可危害包括玉米 *Zea mays* L.、水稻 *Oryza sativa* L.在内的 76 个科、超过 350 种植物，是一种世界范围内的重要的农业害虫 (Lima *et al.*, 2010; Day *et al.*, 2017; Montezano *et al.*, 2018)。草地贪夜蛾具有较强的迁飞能力，已于 2019 年 1 月入侵中国云南省 (张磊等, 2019)，据全国农技中心预测分析，2024 年全国草地贪夜蛾预计发生面积 4 500 万 667 m² 次，西南、华南、江南地区发生代次多、程度重 (全国农业技术推广服务中心病虫害测报处, 2024)。化学农药是防治草地贪夜蛾的主要方法，但入侵我国的草地贪夜蛾种群背景复杂，携带有不同类型的对农药的抗性水平基因，这些对我国草地贪夜蛾防治造成了不少麻烦，同时也呼吁积极开展针对草地贪夜蛾的绿色防控材料的开发和策略的实施 (李永平等, 2019; 吴孔明, 2020)。

对于鳞翅目害虫的生物防治技术形式多样，包括利用微生物制剂 (如细菌、真菌、病毒制剂)、植物源生物农药以及通过保护和增殖当地天敌或引入外来天敌等方式。有报道指出茧蜂科和姬蜂科寄生蜂是草地贪夜蛾的重要天敌 (丁奎婷等, 2023)，寄生在幼虫体内，汲取其营养物质，最终杀死幼虫。利用捕食性昆虫也可以有效控制草地贪夜蛾数量，减少其对农业作物的为害，例如利用叉角厉蝽 *Eocanthecona furcellata*，捕食草地贪夜蛾幼虫，可以有效控制草地贪夜蛾数量，减少其对农业作物的为害 (王瑞玲, 2024)。另外有研究表明，球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 对草地贪夜蛾具有较好的室内活性和田间防效 (程东美等, 2020; 温绍海等, 2022; 邹春华等, 2023; 毕思佳等, 2023)，叶峻豪等从土壤中分离纯化出一株白僵菌菌株 QB10，检测出其对草地贪夜蛾幼虫具有较强的致病性，菌液处理后 1、3、5、7 和 10 d，草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致死中浓度 (LC₅₀) 分别为 8.87×10^7 、 4.98×10^7 、 0.63×10^7 、 0.29×10^7 和 0.19×10^7 cfu/mL (叶峻豪等, 2024)。而在生物防治剂中，微生物农药苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 毒蛋白，与化学农药相比毒性低，对环境安全，在植物病虫害防治中发挥重要作用，其占据了微生物农药 95% 以上的市场，一直吸引着世界生物防治工作者的关注 (Jisha *et al.*, 2013)。但是随着 Bt 的不断使用，有研究表明包括小菜蛾 *Plutella xylostella*、草地贪夜蛾、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* Boddie 和红铃虫 *Pectinophora gossypiella* Saunders 在内的几种鳞翅目害虫对芽孢杆菌产生了抗性 (Tabashnik *et al.*, 1990; Zago *et al.*, 2014; Naik *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019; Yang F *et al.*, 2020)。因此，寻找新的杀虫菌株，探索新的杀虫活性物质，开发新的生物杀虫剂值得更加关注。

自然界本就是一个庞大的资源库，已有报道从昆虫的寄主植物分离获得了具有杀虫活性的昆虫病原细菌 (Zhang *et al.*, 2023)，亦有报道从死亡的、濒死的、甚至健康的昆虫体内分离获得了具有杀虫活性的昆虫病原细菌 (房云, 2010; 牟亚妮等, 2016; Bidari *et al.*, 2018)。

昆虫肠道中栖息着真菌、病毒、细菌等种类繁多、数量庞大的微生物，总称为肠道微生物群。肠道微生物具有协助宿主消化、合成重要营养物质、保护宿主、影响宿主生长发育等功能（石章红和侯有明，2020）。例如，沙雷氏菌 *Serratia* 可以在蚊子的中肠等地方定殖和种群中迅速传播，从而分泌抗疟原虫的效应蛋白抑制疟原虫在体内生长（Gao *et al.*, 2021）。当然，并非所有的肠道微生物都对宿主有益，部分肠道微生物也会对寄主产生不利影响，在昆虫的肠道内还存在着许多的致病菌。埃及伊蚊 *Aedes argypti* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的中肠定殖着一种细菌，它会增加宿主对病毒的敏感性，从而致其死亡（Apte-Deshpande *et al.*, 2012）。这也为本研究筛选可利用菌株、开展绿色防控提供了思路。

本研究从菜青虫肠道分离获得一株对草地贪夜蛾具有明显杀虫活性的克雷伯氏菌 A7，并对其基因组序列进行了报道和分析，为草地贪夜蛾的生防制剂开发与应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试虫采集及饲养

菜青虫幼虫采自湖南省长沙市芙蓉区油菜花田（113°E，28°N）。草地贪夜蛾虫卵购自河南科云生物有限公司，于人工气候养虫室用人工饲料饲养得到实验种群。生长温度 27°C ± 0.5°C，相对湿度 70% ± 5%，光照条件 L : D=12 : 12，每天定时更换饲料。

1.2 宿主昆虫肠道细菌的分离及培养

于冰块上解剖菜青虫幼虫，用磷酸缓冲液（pH7.8）将中肠内含物进行梯度稀释，从 10⁰ 稀释到 10⁻²，共稀释 3 个梯度。取中肠磷酸混合液涂布于 LB（Luria-Bertani）固体培养基于 30°C 培养箱培养 12~24 h。根据菌落形状和颜色等选择不同类型的菌落，重复 3~5 次划线纯化，直到形成形态一致的菌落。纯化结束后挑取单菌落细菌到 LB 液体培养基中，放置于 30°C，200 rpm 摇床中活化，之后分别吸取 750 μL 的 50% 甘油和 750 μL 的菌液加入到 1.5 mL 的离心管中，于 -80°C 备用。

1.3 对小菜蛾杀虫活性测定

取 A7 培养菌株的新鲜菌落，转移到液体 LB 培养基中，在 30°C、200 rpm 的摇床上培养 3 d，将菌液用于进行杀虫活性的测定。将人工饲料切成 0.5~0.8 cm³ 的方块，在室温下加入上述新鲜菌液中浸泡 30 min。然后将饲料取出，在室温下风干 1 h，转移到 24 孔的昆虫培养盒中（每孔的长度、宽度和高度分别为 2 cm、2 cm、2.5 cm）。以 LB 培养基浸泡饲料块作为空白对照。分别将小菜蛾 2 龄幼虫放入养虫盒中，进行 3 个重复，每个重复中包含 24 头幼虫，每天观察并记录死亡的幼虫，直到所有的幼虫都死亡或化蛹。计算幼虫化蛹前

的幼虫死亡率，采用 SPSS v22.0 进行独立样本 t 检验（Independent Samples t-test）分析不同处理下的每个幼虫的死亡率，使用 GraphPad Prism（v9.0.0，GraphPad Software 公司）绘制图表，标注差异显著性。

1.4 对草地贪夜蛾杀虫活性检测及初步筛选

取每个培养菌株的新鲜菌落，转移到液体 LB 培养基中，在 30°C、200 rpm 的摇床上培养 1 d、2 d、3 d，将菌液用于进行杀虫活性的测定。将人工饲料切成 0.5~0.8 cm³ 的方块，在室温下加入上述新鲜菌液中浸泡 30 min。然后将饲料取出，在室温下风干 1 h，转移到 24 孔的昆虫培养盒中（每孔的长度、宽度和高度分别为 2 cm、2 cm、2.5 cm）。以 LB 培养基浸泡饲料块作为空白对照。分别将草地贪夜蛾 2 龄幼虫放入养虫盒中，进行 3 个重复，每个重复中包含 24 头幼虫，每天观察并记录死亡的幼虫，直到所有的幼虫都死亡或化蛹。计算幼虫化蛹前的幼虫死亡率，在反正弦转换后，采用单因素方差分析（Analysis of Variance, ANOVA）分析不同处理下的每个幼虫的死亡率，采用 SPSS v22.0 进行最小显著差数法（Least significant difference, LSD）比较。使用 GraphPad Prism（v9.0.0，GraphPad Software 公司）绘制图表，标注差异显著性。

1.5 总 DNA 提取

细菌基因组 DNA 的提取参照 SteadyPure 通用型基因组 DNA 提取试剂盒（AG, Accurate biotechnology, Hunan）提供的说明书对培养 3 d 的菌液进行细菌基因组 DNA 提取，将提取的 DNA 于 -20°C 保存。

1.6 菌株的生理生化的特性检测

参照《伯杰式细菌鉴定手册》（第 8 版）（布坎南和吉本斯，1984）和《常见细菌系统鉴定手册》的有关实验方法进行 5 项生理生化的鉴定（东秀珠等，2001）。革兰氏阴性细菌记为“-”，革兰氏阳性细菌记为“+”；观察到大量气泡，为过氧化氢酶反应阳性细菌，记为“+”；没有观察到气泡，为过氧化氢酶反应阴性细菌，记为“-”。出现红色为 V-P 实验阳性细菌，记为“+”；没有变化为 V-P 实验阴性细菌，记为“-”。菌落周围有透明圈，其他地方呈现蓝色为淀粉水解阳性细菌，记为“+”，培养基全部呈现蓝色为淀粉水解阴性细菌，记为“-”。观察培养液呈红色为吡啶检测阳性细菌，记为“+”；没有变化为吡啶检测阴性细菌，记为“-”。

1.7 基于 16S rDNA 基因序列的菌株鉴定

提取完 DNA，以 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和 1492R（5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'）为引物对基因片段进行聚合酶链式反应（Polymerase

Chain Reaction, PCR) 扩增。反应总体系 25 μL : PCR Buffer (AG) 2.50 μL , dNTP (AG) 0.50 μL , 上下游引物各 1.00 μL , rTaq DNA polymerase (AG) 0.15 μL , 模板 DNA 2.00 μL , dd H₂O 17.85 μL 。反应程序: 94°C 预变性 5.0 min, 变性 50 s; 在 45~60°C 下退火 50 s、72°C 延伸 10 min, 27 个循环, 最后将产物送往湖南擎科生物公司进行测序。将测序结果在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行 BLAST 分析, 辅助判断细菌分离物所属分类地位。进一步从 NCBI 数据库中选取同源性较高的 10 个菌株的 16S rDNA 序列、并以 1 个同源性较低的菌株作为外群, 进行系统发育树分析。使用 MEGA11 (v10.01) 软件, 采用 Neighborjoining 法, 选用 P-distance 模型构建进化树, 进化树用 Bootstrap analysis 法进行检验, 重复 1 000 次。

1.8 A7 菌株全基因组测序及功能注释

将 A7 菌株的 DNA 样品送至华大基因有限公司进行 Illumina NovaSeq 6000 系统测序, 将得到的基因组序列用于生物信息学分析。通过 BLAST 将基因蛋白序列与多个数据库进行比对, 获得功能注释信息, 使用的数据库包括: GO (Gene Ontology, <https://www.geneontology.org/>)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>)、COG (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>)。利用毒力基因数据库 (Virulence Factor Database, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 预测 A7 菌株基因组中存在的毒力基因。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及初步筛选

经过分离纯化后得到了菜青虫肠道分离细菌共 53 种, 而初步筛选后仅有 9 株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫有明显的生长抑制作用或有致死性。这 9 株编号细菌分别为 A7、A34、B18、B21、B22、B27、B29、B37、B42, 置于体视镜下观察其颜色及其具体形态 (图 1)。

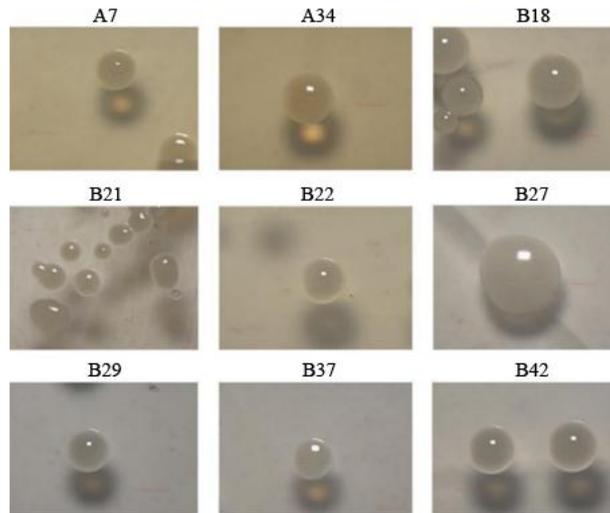


图 1 9 株菜青虫肠道菌落在体视镜下的形态

Fig. 1 Morphology of 9 bacteria colonies isolated from the guts of *Pieris rapae* with stereoscopy

2.2 菌株的鉴定及生理生化特性的研究

对 9 种编号的细菌在体视镜中进行菌落颜色、形状及边缘的观察（表 1），并进行了生理生化的特性研究（表 2）。

表 1 9 种编号细菌菌落的基本特征

Table 1 Colony characteristics of 9 bacterial isolates

细菌编号 Bacterium number	菌落颜色 Colony color	菌落形状 Cell shape	菌落边缘 Colony shape
A7	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
A34	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B18	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B21	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B22	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B27	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B29	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B37	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth
B42	白色 White	圆形 Circular	光滑 Smooth

表 2 9 种编号细菌的生理生化特性鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of 9 bacterial isolates

细菌编号 Bacterium number	革兰氏反应 Gram reaction	过氧化氢酶反应 Catalase reaction	V-P 反应 V-P reaction	淀粉水解 Starch hydrolysis	吲哚反应 Indole reaction

A7	-	+	-	-	+
A34	-	+	-	+	+
B18	-	+	-	+	+
B21	-	+	-	-	+
B22	-	+	-	-	+
B27	-	+	-	-	+
B29	-	+	-	-	+
B37	-	+	-	-	+
B42	-	+	-	-	+

注：表中“+”表示阳性，“-”表示阴性。Note: In the table “+” meant positive reaction, “-” meant negative position.

2.3 菌株 A7 的 16S rDNA 基因序列分析

基于菌株 A7 全基因组序列中 16S rDNA 基因序列在 NCBI 上查找同源序列并进行比对，发现 A7 的 16S rDNA 序列与克雷伯氏菌属中的肺炎克雷伯氏菌、其他的克雷伯氏菌多个菌株的相似性均高于 99%，构建 16S rDNA 序列的系统发育树（图 2），进一步展示了 A7 的分类地位。

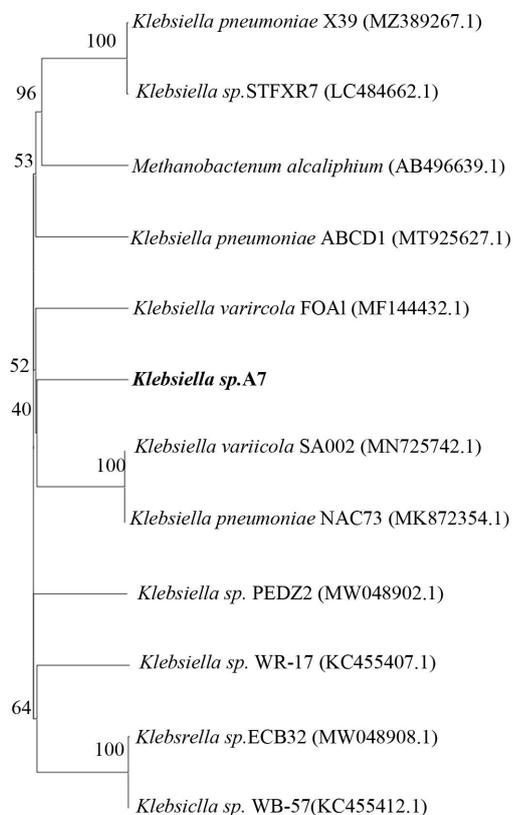


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

2.4 A7 菌株对小菜蛾杀虫活性测定

将 A7 菌液饲喂小菜蛾 2 龄幼虫，并检测试虫在暴露后 24 h、72 h、120 h 的死亡率（图 3）。A7 菌液处理组试虫在暴露 24 h、72 h、120 h 的死亡率分别为 $48.61\% \pm 2.41\%$ 、 $51.39\% \pm 2.41\%$ 和 $54.17\% \pm 7.22\%$ ，都显著高于对照组 CK ($P < 0.05$)，由此可见，A7 菌株对于小菜蛾也有一定的致病力。

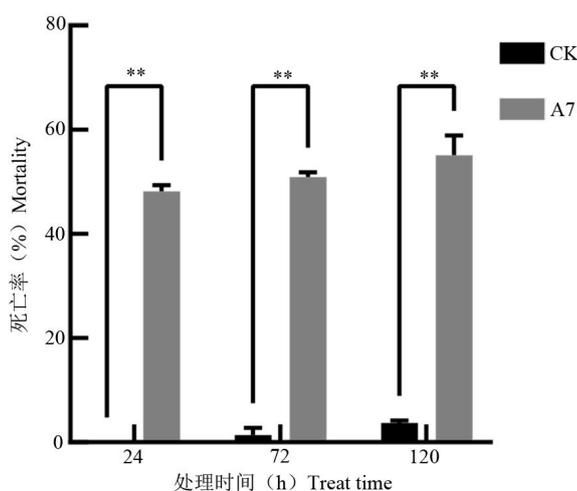


图 3 A7 菌液对小菜蛾的致死率

Fig. 3 The mortality of A7 bacterial suspension to *Plutella xylostella*

注：星号表示基于独立样本 t 测验后，A7 处理组与对照组(CK)之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。Note: The asterisk indicated a significant difference ($P < 0.05$) between the A7 treatment group and the control group (CK) based on independent t-test.

2.5 不同培养时期的 9 株菌株对草地贪夜蛾杀虫活性测定

将培养 1 d、2 d、3 d 后的 A7 菌液分别饲喂 2 龄草地贪夜蛾幼虫，并检测试虫在暴露后 24 h、72 h、120 h 的死亡率（图 4）。9 株菌液在活化 1 d 后都与 CK 组出现了不同程度的显著性差异 ($P < 0.01$)。对于活化 1 d 和 2 d 的菌株而言（图 4-B、E），A7 菌株从 72 h ($F_{1d, B21}=4.35$, $P_{1d, B21} < 0.05$; $F_{1d, A34}=7.042$, $P_{1d, A34} < 0.05$; $F_{1d, B18}=5.192$, $P_{1d, B18} < 0.05$; $F_{1d, B37}=3.971$, $P_{1d, B37} < 0.05$; $F_{2d, B21}=4.355$, $P_{2d, B21} < 0.05$; $F_{2d, A34}=7.042$, $P_{2d, A34} < 0.05$; $F_{2d, B18}=5.192$, $P_{2d, B18} < 0.05$; $F_{2d, B37}=3.971$, $P_{2d, B37} < 0.05$) 开始对草地贪夜蛾幼虫的死亡率显著高于 B21、A34、B18、B37 菌株，在 120 h (图 4-C、F) ($F_{1d, B21}=3.902$, $P_{1d, B21} < 0.05$; $F_{1d, A34}=6.516$, $P_{1d, A34} < 0.05$; $F_{1d, B18}=4.384$, $P_{1d, B18} < 0.05$; $F_{2d, B21}=3.902$, $P_{2d, B21} < 0.05$; $F_{2d, A34}=5.548$, $P_{2d, A34} < 0.05$; $F_{2d, B18}=4.558$, $P_{2d, B18} < 0.05$) 对草地贪夜蛾幼虫的死亡率显著高于 B21、A34、B18 菌株。在菌液活化 3 d 的情况下，A7 菌株相较于其他菌株表现出

了更高的致死率，在第 72 小时之后对幼虫的死亡率显著高于其他 8 株菌株 ($P<0.05$) (图 4-H)，其最高致死率为 $56.25\% \pm 10.26\%$ ，可以看出 A7 菌株的杀虫活性也是这 9 株细菌中最高和最稳定的。所以在后续实验中对 A7 进行了全基因组分析。

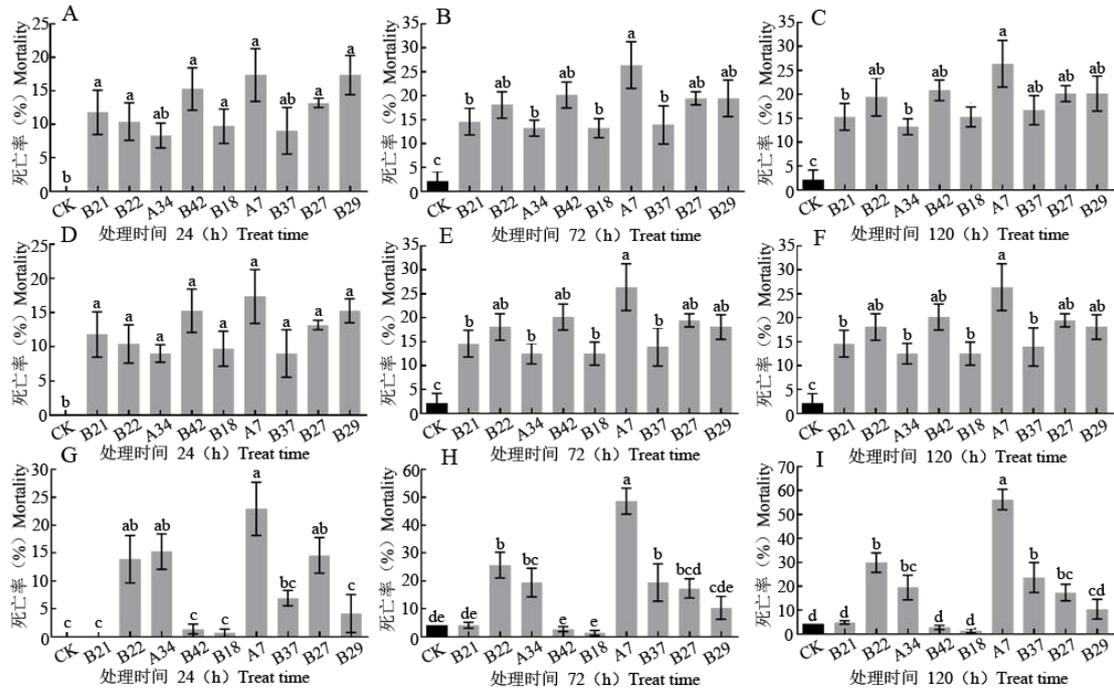


图 4 菌液培养 1 d、2 d、3 d 时各菌株的致死率

Fig. 4 The mortality of each strain during 1, 2, 3 days of bacterial incubation

注：A、B、C 分别为试虫暴露在 1 d 的菌株培养后，24 h、72 h、120 h 的死亡率；D、E、F 分别为试虫暴露在 2 d 的菌株培养后，24 h、72 h、120 h 的死亡率；G、H、I 分别为试虫暴露在 3 d 的菌株培养后，24 h、72 h、120 h 的死亡率；误差棒上的小写字母表示基于单因素方差分析后，由最小显著差数法标注出的差异显著性 ($\alpha=0.05$)。Note: In the figure, A, B, and C were the mortality of larvae after exposed to the 1 d bacterial cultivation for 24 h, 72 h, and 120 h; D, E, and F were the mortality of larvae after exposed to the 2 d bacterial cultivation for 24 h, 72 h, and 120 h; and G, H, and I were the mortality of larvae after exposed to the 3 d bacterial cultivation for 24 h, 72 h, and 120 h; the lowercase letters on the error bars represent the significance of the differences based on one-way ANOVA, as indicated by the least significant difference (LSD) method ($\alpha=0.05$).

2.6 菌株 A7 的基因组序列组装及基本信息

菌株 A7 的基因组 DNA 经过 PacBio Reads 平台的测定、质控分析和组装，其基因组包含 1 条环状双链染色体 (表 3) 和 3 个环状质粒 (表 4)，基因组总长度为 7 510 074 bp，GC 含量 51.78%，含有 8 148 个编码基因；3 个环状质粒总长度分别为 190 495 bp、89 806 bp 和 77 436 bp。

表 3 A7 基因组 DNA PacBio Reads 数据统计

Table 3 Statistics of A7 genomic DNA PacBio Reads

样品名称	基因组大小	总数	总长度 (bp)	长度/基因组长度 (%)	GC 含量 (%)
ID name	Genome size	Total number	Total length	Length / Genome length	GC content
A7	8 550 846	8 148	7 510 074	87.83	51.78

表 4 A7 基因组质粒 PacBio Reads 数据统计

Table 4 Statistics of A7 genomic plasmid PacBio Reads

样品名称	序列拓扑结构	总长度 (bp)	GC 含量 (%)
ID Name	Sequence Topology	Total Length	GC Content
质粒 1 Plasmid 1	圆形 Circular	190 495	49.57
质粒 2 Plasmid 2	圆形 Circular	89 806	49.73
质粒 3 Plasmid 3	圆形 Circular	77 436	54.35

2.7 菌株 A7 的基因功能注释

2.7.1 GO 数据库注释

A7 编码基因在 GO 数据库中注释结果中发现, A7 编码基因在 GO 数据库中注释的基因数目总共有 17 575 个, 与生物过程相关的基因种类和数量都是最多的, 有 20 类 9 064 个, 其中数量最多的是细胞过程类基因, 为 3 223 个; 其次是代谢过程类基因, 为 2 913 个; 其余数量较多的有本地化相关基因 944 个, 生物学调控类基因 655 个, 生物过程调控类基因 637 个, 刺激反应类基因 324 个。与细胞成分相关的基因有 3 类 2 358 个, 其中数量最多的是细胞解剖实体类基因, 有 1 743 个; 其次为细胞内基因, 有 398 个; 含有复合物蛋白类基因有 217 个。与分子功能相关的基因有 10 类 6 153 个, 其中催化活性和结合基因最多, 分别有 2 888 个和 2 051 个; 其次是转运活性和转录调节活性基因, 分别有 637 个和 275 个(图 5)。

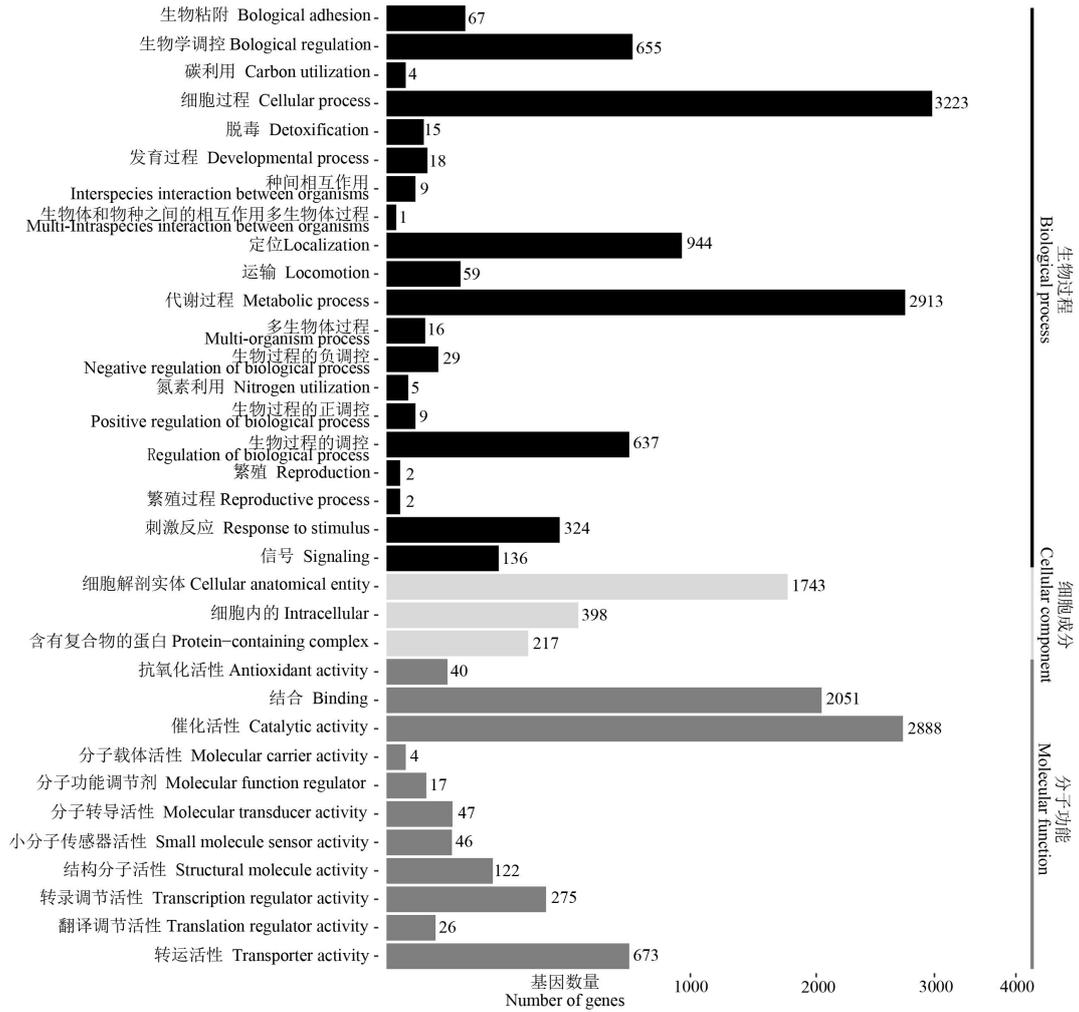


图 5 A7 的 GO 功能注释分类

Fig. 5 GO function classification of strain A7

2.7.2 KEGG 数据库注释

A7 编码基因在 KEGG 数据库中注释结果发现，A7 编码基因在 KEGG 数据库中注释的基因数目总共有 6 286 个，与代谢相关的基因有 4 275 个，其中氨基酸代谢相关基因 475 个，其他次生代谢的生物合成的基因 88 个，糖代谢基因 525 个，能量代谢基因 309 个，全局和总览图基因 1 688 个，多糖合成和代谢相关基因 139 个，脂类代谢相关基因 169 个，辅助因子和维生素代谢基因 351 个，其他氨基酸代谢基因 141 个，萜类和聚酮类代谢物合成基因 76 个，核苷酸代谢相关基因 174 个，外源物质生物降解和代谢相关基因 140 个。与细胞过程相关的基因有 1 163 个，其中膜运输相关基因 424 个，信号转导基因 283 个，细胞群落-原核生物基因 277 个（图 6）。

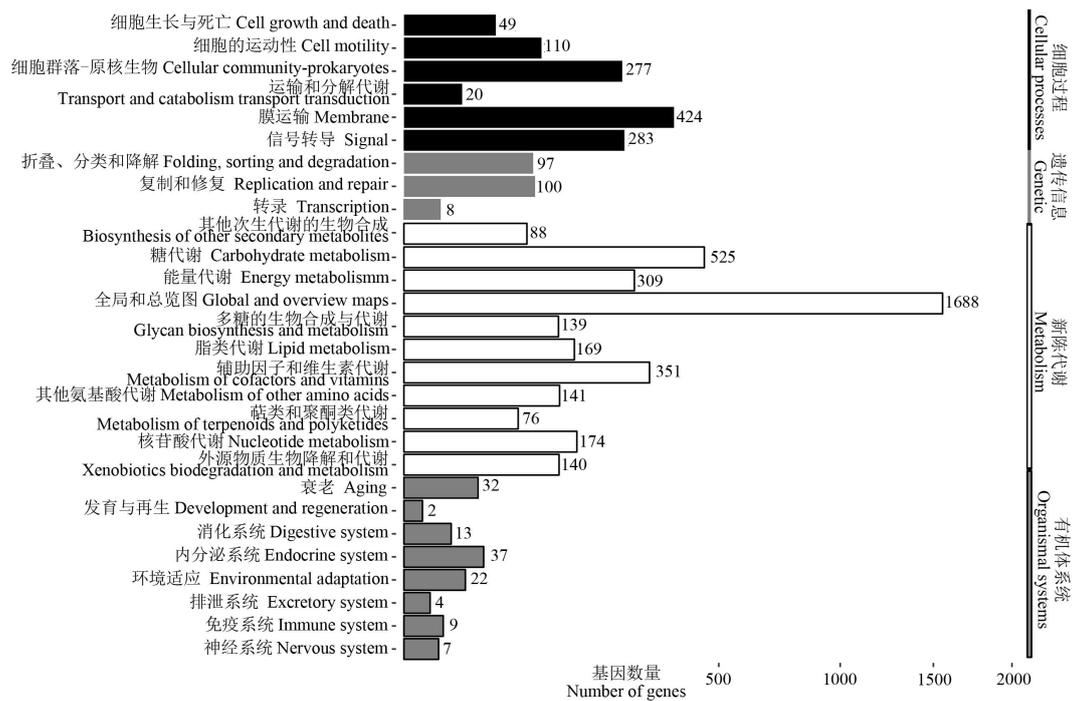


图6 A7的KEGG功能注释分类

Fig. 6 KEGG function classification of strain A7

2.7.3 COG 数据库注释

A7 编码基因在 COG 数据库中注释结果发现，注释的基因数目总共有 7 210 个，其中氨基酸转运与代谢基因最多，有 647 个；其次为碳水化合物转运与代谢基因和转录基因分别为 589 个和 576 个；一般功能预测相关基因 490 个，翻译、核糖体结构和生物合成基因 489 个，细胞壁/膜/包膜的生物合成基因 488 个，无机离子转运与代谢基因 415 个，能量生产与转化基因 398 个，信号转导机制基因 356 个，脂质转运与代谢基因 347 个（图 7）。

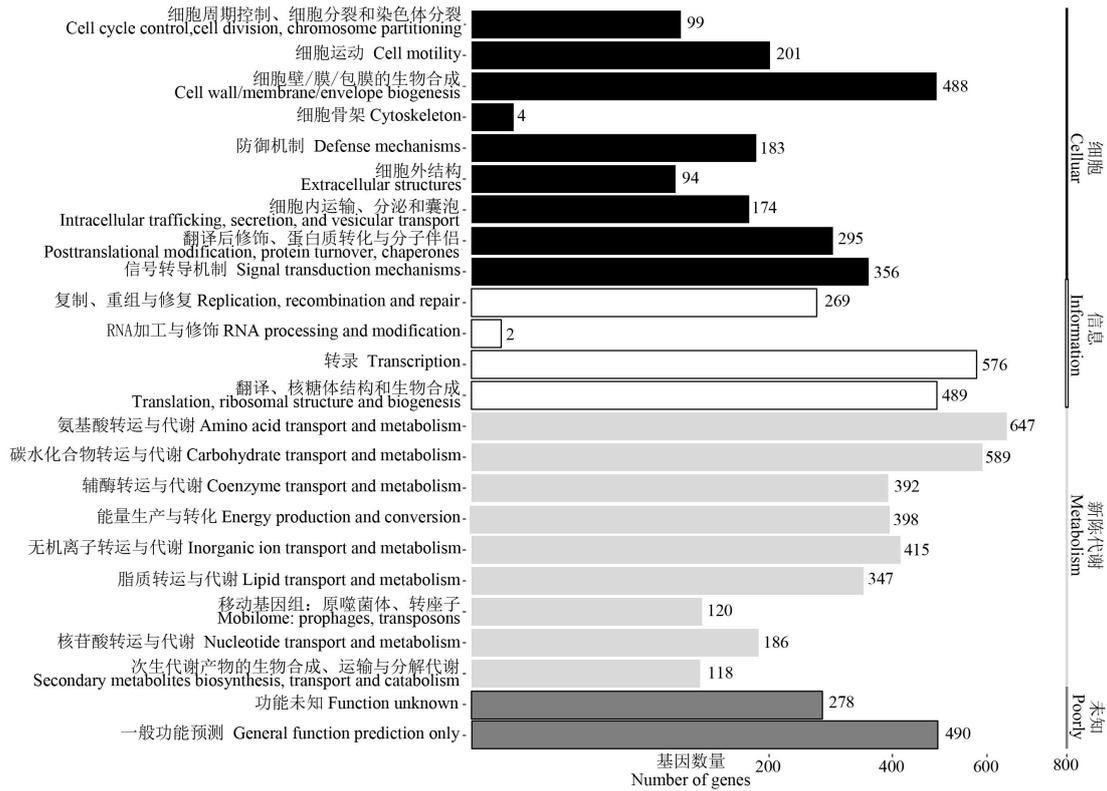


图7 A7的COG功能注释分类

Fig. 7 COG function classification of strain A7

2.8 748种毒力基因的检出率结果

748种毒力基因中，有214种检出率在70%以上，306种检出率低于50%，其余228种基因检出率在50%~70%之间（图8）。毒力基因的检出率分布图呈现出随着检出率升高，基因数量越少的特点。

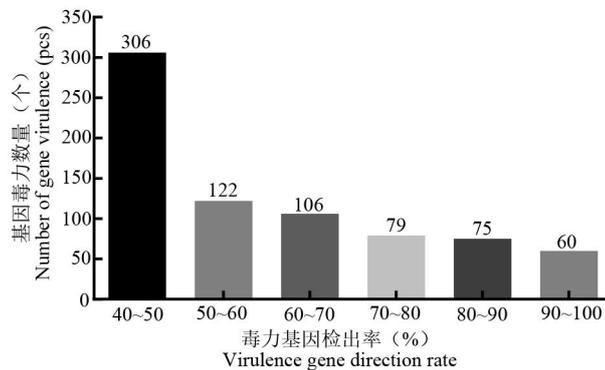


图8 毒力基因检出率与种数之间的关系

Fig. 8 The relationship between virulence gene detection rate and the number of species

2.9 A7菌株毒力基因功能分类

对检出率大于 70%的毒力基因进行分析（表 5）。基于 VFDB 数据库对基因的功能注释结果，所有的 214 种毒力基因被分为 14 类。其中粘附性、效应因子传递系统、免疫调节、运动性和营养/代谢因子 5 类功能基因合计占比为 76.64%。粘附类基因主要涉及与定殖密切相关的菌毛和粘附蛋白编码基因。在效应因子传递系统类中，编码 T6SS 的基因所占比例最大，它们有的编码分泌系统组成的结构蛋白，有的编码分泌系统的效应因子被运送到宿主细胞中，协助菌株入侵宿主环境并在宿主细胞中生存。免疫调节类主要是编码表面抗原的毒力基因，以抵抗宿主的免疫防御，促进全身传播。鞭毛是运动类的主要毒力因子，具有促进运动和趋化的作用。编码铁转运蛋白以及生物合成相关酶的毒力基因在营养和代谢类中占很大比例，其编码产物保证了 A7 菌株在宿主中的正常生存。此外，还有编码调节因子、细胞外毒素、生物膜和应激反应等相关的基因。

表 5 对 214 种毒力基因的功能分类

Table 5 Functional classification of 214 virulence genes

类别 Type	毒力基因数量（种） Number of virulence genes (piece)	所占比例（%） Proportion
粘附性 Adherence	24	11.21
抗菌活性/竞争优势 Antimicrobial activity/competitive advantage	4	1.87
生物膜 Biofilms	4	1.87
效应因子传递系统 Effector delivery system	41	19.16
胞外酶 Exoenzyme	1	0.47
外毒素 Exotoxin	3	1.40
免疫调节 Immunomodulation	20	9.35
侵袭性 Invasion	3	1.40
运动性 Motility	59	27.57
营养/代谢因子 Nutritional/Metabolic factor	20	9.35
翻译后修饰	2	0.93

Post-translational modification		
调节因子 Regulation	4	1.87
应激反应 Stress survival	5	2.34
其他 Others	26	11.21

3 结论与讨论

随着人们环保意识的提高，环境友好型生物杀虫剂因其专一、低毒、安全性强等特点被广泛接受，其主要以昆虫病原细菌的研究应用为主（Lee and Brey, 2013），细菌生物杀虫剂占据了微生物杀虫剂大约 74% 的市场份额，其中苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的应用最为广泛。然而，由于近年来一些鳞翅目害虫包括棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、小菜蛾等对 Bt 制剂产生了抗性进化问题，开发新型安全有效的昆虫病原细菌替代 Bt 用于害虫生物防治成为了研究热点（Jisha *et al.*, 2013; Mnif *et al.*, 2015）。He 等（2019）从大蜡螟 *Galleria mellonella* 中分离出克雷伯氏菌，并检验出克雷伯氏菌对粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的致病性；Bidari 等（2018）从金龟子 *Polyphylla olivieri* 幼虫中分离出一种红色素沉着的沙雷氏菌 *Serratia*，采用细菌培养以及针对印度谷螟 *Plodia interpunctella* 和地中海斑螟 *Ephestia kuehniella* 幼虫进行杀虫活性测定，结果发现显著降低了幼虫的存活率。本研究从菜青虫体内分离到一株对草地贪夜蛾具有杀虫活性的克雷伯氏菌，为通过生物杀虫剂来防治草地贪夜蛾提供了新思路。

克雷伯氏菌 *Klebsiella sp.* 普遍存在于自然界中，除寄生于人和动物的上呼吸道和胃肠道，还能在诸如昆虫、植物等环境中生存。（Huang *et al.*, 2022）肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 是该属细菌的模式种，主要寄生于人体皮肤、鼻咽部、肠道、动物的粘膜表面，几乎可引起身体任何部位的感染。因其具有多重抗生素抗性而被人们所熟知和研究，是仅次于大肠杆菌 *Escherichia coli* 的最重要的人和动物的条件致病菌（Craven, 2006）。从现有的研究报告中发现可以从大蜡螟中分离出克雷伯氏菌，并检验出克雷伯氏菌对粉纹夜蛾的致病性（He *et al.*, 2019）。克雷伯氏菌隶属于变形菌门 *Proteobacteria*，肠杆菌科 *Enterobacteriaceae*，为革兰氏阴性菌。目前，对克雷伯氏菌的研究主要是在医院环境和临床病人方面（Cao *et al.*, 2014），克雷伯氏菌普遍存在于昆虫体内，且对昆虫具有一定的致病性。例如在以往的研究中 Mohanta 等从家蚕 *Bombyx mori* 中分离出的克雷伯氏菌在针对同一宿主 3 龄幼虫进行试验时显示出高杀虫活性（Cakici *et al.*, 2014; Mohanta *et al.*, 2015）；He 等（2019）从大蜡螟幼虫中分离出的肺炎克雷伯菌也引起粉纹夜蛾幼虫的交叉致病性。本研究从菜青虫肠道分

离并鉴定了一株可培养菌株 A7，通过对细菌的 16S rDNA 基因进行测序并构建系统发育进化树，结果表明该菌株属于克雷伯氏菌属，使用饲料浸泡法饲喂幼虫测得菌株 A7 在培养 3 d 后对草地贪夜蛾幼虫的致死率为 $56.25\% \pm 10.26\%$ 。以上研究表明，克雷伯氏菌对昆虫的死亡率具有一定影响，该菌在生物防治领域有着巨大潜力。

微生物种群的生长数据通常被记录为生长曲线，即在一定生长条件下细菌种群密度随时间的变化 (Maier and Pepper, 2014)。实验室条件下一般利用特定的培养基在营养和生存环境可控的条件下培养细菌，细菌的生长曲线一般可呈现近 S 型。苏云金芽胞杆菌之所以能够对昆虫有活性，其主要杀虫活性成分是能够在芽孢期产生的伴孢晶体 (张路路, 2014)。孔芳等 (2014) 在被污染的蝴蝶兰初代培养基中分离筛选苏云金芽胞杆菌伴孢晶体产生菌 BZ-1，该菌株从培养 2 d 芽孢形成后开始分泌相对分子质量约 130 000 的晶体蛋白，4 d 时蛋白表达量增加，6 d 后蛋白表达量基本达到稳定，表明不同培养时间会对伴孢晶体的产生有影响。有研究通过对细菌质量检测发现，随着培养时间的增加，爱德华氏菌 *Edwardsiella* 的质量均呈先上升、再平缓、后下降的变化趋势，这可能与培养基是一个有限环境和细菌间存在个体竞争有关 (陈子强等, 2024)。猪丹毒杆菌又称红斑丹毒丝菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae*，有研究发现将培养 24 h 的丹毒强毒菌攻毒后的小白鼠保护百分数与培养 21 h 和 19 h 的丹毒强毒菌攻毒后的小白鼠保护百分数进行百分数差异显著性检验，*P* 值均小于 0.01，差异极显著。最大可能是丹毒强毒菌在培养到 24 h 时，其生命力最旺盛，从而对小白鼠的毒力相应增强 (陈天祥等, 1986)。多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida* 在通气培养 11 h 即可达到高峰，11 h 后菌数逐渐降低，可能是由于培养基营养消耗殆尽，细菌逐渐死亡的缘故 (刘春, 1986)。在本研究中 A7 菌在摇床中培养 1 d、2 d 和 3 d 时也呈现出不同杀虫活性，但其具体杀虫活性机制研究还需进一步探讨和验证。

A7 菌株通过 VFDB 数据库中注释到 13 类毒力因子，提供了该菌具有致病性的遗传基础，其中粘附性、效应因子传递系统、免疫调节、运动性和营养/代谢因子 5 类功能基因合计占比为 76.64%。克雷伯氏菌 A7 株的毒力因子中占比最高的是运动性毒力基因 27.57%，鞭毛是运动类的主要毒力因子，具有促进运动和趋化的作用。而在粘附性的毒力因子中最引人注目目的就是菌毛，这些菌毛与生物膜形成能力、黏附能力、外源 DNA 的摄取、蛋白分泌能力、运动能力以及定殖和侵袭能力密切相关 (Merz *et al.*, 2000; Abby *et al.*, 2001; Sangermani *et al.*, 2019)。这些菌毛在生命周期中选择性表达，显著促进了菌体的适应性，增强了菌体的致病性 (Li *et al.*, 2001)。因此，进一步研究克雷伯氏菌属的毒力因子及其作用机制对于深入了解克雷伯氏菌的致病机制和开发新的治疗策略非常重要。考虑到毒力作

用的复杂性,本研究还存在一些局限性。如未明确这些毒力基因的基因环境以及它们与致病性之间的具体关联,因此需要通过进一步功能试验进行验证。

综上,本研究对从菜青虫体内分离出来的克雷伯氏菌 A7 株进行了对于草地贪夜蛾的杀虫活性分析研究、全基因组分析以及毒力基因检测,结果表明 A7 株是菜青虫分离菌株中杀虫活性最高、最稳定的菌株,在培养 3 d 时杀虫活性最高,且 A7 株携带不同类型毒力基因并具有较强毒力。本研究为内生菌在生物防治中的应用提供了新材料,对其毒力发展和后续深入研究提供了参考。

参考文献 (Reference)

- Abby SS, Cury J, Guglielmini J, *et al.* Identification of protein secretion systems in bacterial genomes [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23080.
- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, *et al.* *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (7): e40401.
- Bi SJ, Hu CY, Hu BJ, *et al.* Isolation and identification of the *Beauveria bassiana* Bb378 strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2023, 60 (4): 1223-1232. [毕思佳, 吴晨源, 胡本进, 等. 球孢白僵菌 Bb378 菌株的分离、鉴定及对草地贪夜蛾的致病性研究 [J]. 应用昆虫学报, 2023, 60 (4): 1223-1232]
- Bidari F, Shams-Bakhsh M, Mehrabadi M. Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2018, 142 (1-2): 162-172.
- Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. Beijing: China Science Publishing, 1984. [布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984]
- Cakici FO, Sevim A, Demirbag Z, *et al.* Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents [J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2014, 38 (1): 99-110.
- Cao X, Xu X, Zhang Z, *et al.* Molecular characterization of clinical multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2014, 13 (1): 1-5.
- Chen TX, Yang H, Zhang CQ. Comparative tests on the attack of strong virulent bacterial solutions of *Mycobacterium bovis* (C43-6, 8) with different incubation times [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 1986, 2: 32-33. [陈天祥, 杨宏, 张长秋. 不同培养时间的猪丹毒杆菌(C43-6、8)强毒菌液攻毒比较试验 [J]. 兽医药品通讯, 1986, 2: 32-33]
- Chen ZQ, Xia LH, Li XX, *et al.* Effect of pH, temperature and medium on the growth of *Edwardsiella* spp. [J]. *Journal of Aquaculture*, 2024, 45 (7): 1-5, 43. [陈子强, 夏理海, 李雪贤, 等. pH 值、温度及培养基对爱德华氏菌生长的影响 [J]. 水产养殖, 2024, 45 (7): 1-5, 43]
- Cheng DM, Hong WW, Sun H, *et al.* Survey on the cadaver rates of *Spodoptera frugiperda* and isolation of pathogenic strain [J]. *Journal*

- of *Environmental Entomology*, 2020, 42 (6): 1298-1304. [程东美, 洪婉雯, 孙辉, 等. 草地贪夜蛾幼虫僵虫发生率调查及致病菌分离鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (6): 1298-1304]
- Craven DE. What is healthcare-associated pneumonia, and how should it be treated [J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2006, 19: 153-160.
- Day R, Abrahams P, Bateman M, *et al.* Fall armyworm: Impacts and implications for Africa [J]. *Outlooks on Pest Management*, 2017, 28: 196-201.
- Ding KT, Du SJ, Yang NW, *et al.* Research progress on comprehensive control techniques of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in China [J]. *Journal of Biosafety*, 2023, 32 (4): 291-302. [丁奎婷, 杜素洁, 杨念婉, 等. 草地贪夜蛾综合防控技术研究进展 [J]. 生物安全学报, 2023, 32 (4): 291-302]
- Dong XZ, Cai MY. Handbook of Systematic Identification of Common Bacteria [M]. Beijing: China Science Publishing, 2001. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001]
- Fang Y. Identification of Entomopathogenic Symbolic Bacteria 09FLYB1 and Purification of its Insecticidal Proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University Master Thesis, 2010. [房云. 昆虫病原线虫共生菌菌株 09FLYB1 的分离鉴定及其杀虫毒素蛋白的分离纯化与活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学硕士论文, 2010]
- Gao H, Bai L, Jiang Y, Huang W, *et al.* A natural symbiotic bacterium drives mosquito refractoriness to *Plasmodium* infection via secretion of an antimalarial lipase [J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6 (6): 806-817.
- He Y, Qin Q, DiLegge MJ, *et al.* Isolation of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* from entomopathogenic nematode-insect host relationship to examine bacterial pathogenicity on *Trichoplusia ni* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 135: 103606.
- Huang M, He PB, He PF, *et al.* Research advances in effects of *Klebsiella pneumoniae* on plants [J]. *Phytopathology Research*, 2022, 52 (4): 511-521. [黄敏, 何鹏搏, 何鹏飞, 等. 肺炎克雷伯氏菌对植物影响的研究进展 [J]. 植物病理学报, 2022, 52 (4): 511-521]
- Jisha VN, Smitha RB, Benjamin S. An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Advances in Microbiology*, 2013, 3 (5): 462-472.
- Kong F, Gao Y, Zhu JH, *et al.* Isolation, screening and identification of parasporal crystal-producing *Bacillus thuringiensis* strain BZ-1 [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2014, 27 (9): 1153-1157, 1163. [孔芳, 高勇, 朱霁晖, 等. 苏云金芽孢杆菌伴胞晶体产生菌 BZ-1 的分离筛选及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (9): 1153-1157, 1163]
- Lee WJ, Brey PT. How microbiomes influence metazoan development: Insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2013, 29: 571-592.
- Li X, Rasko DA, Lockett CV, *et al.* Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product [J]. *Embo. Journal.*, 2001, 20 (17): 4854-4862.

- Li YP, Zhang S, Wang XJ, *et al.* Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and strategies for its chemical control [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (4): 14-19. [李永平, 张帅, 王晓军, 等. 草地贪夜蛾抗药性现状及化学防治策略 [J]. 植物保护, 2019, 45 (4): 14-19]
- Lima M, Silva P, Oliveira O, *et al.* Corn yield response to weed and fall armyworm controls [J]. *Planta daninha*, 2010, 28 (1): 103-111.
- Liu C. Comparative experiments on the number of long bacteria and pH of bacterial solution at different incubation times of *Pasteurella multocida* of chicken origin [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 1986, 4: 17-18. [刘春. 鸡源多杀性巴氏杆菌不同培养时间的长菌数和菌液 pH 的比较试验 [J]. 兽医药品通讯, 1986, 4: 17-18]
- Maier RM, Pepper IL. Bacterial growth [J]. *Environmental Microbiology*, 2015: 37-45.
- Merz A, So M, Sheetz M. Pilus retraction powers bacterial twitching motility [J]. *Nature*, 2000, 407: 98-102.
- Mnif I, Ghribi D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management [J]. *Crop Protection*, 2015, 77: 52-64.
- Mohanta MK, Saha AK, Saleh DK, *et al.* Characterization of *Klebsiella granulomatis* pathogenic to silkworm, *Bombyx mori* L. [J]. *3 Biotech*, 2015, 5 (4): 577-583.
- Montezano, Specht A, Sosa-Gómez DR, *et al.* Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas [J]. *African Entomology*, 2018, 26 (2): 286-300.
- Mou YN, Xu ZY, Weng XQ, *et al.* Characterization and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strain BRC-CXG5 and its toxicity to *Monochamus alternatus* hope larva [J]. *Current Biotechnology*, 2016, 6 (1): 41-46. [牟亚妮, 徐卓吟, 翁小倩, 等. 铜绿假单胞菌 BRC-CXG5 菌株的分离鉴定及其对松墨天牛幼虫的杀虫活性 [J]. 生物技术进展, 2016, 6 (1): 41-46]
- Naik VC, Kumbhare S, Kranthi S, *et al.* Field-evolved resistance of pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), to transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) cotton expressing crystal 1Ac (Cry1Ac) and Cry2Ab in India [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74 (11): 2544-2554.
- National Agro-Tech Extension and Service Center. Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* control technical plan in 2024 [EB/OL]. (2024-03-12) [2024-11-01]. https://hnppi.cn/web/hnzbzj/10058/10059/content_339222.html. [全国农业技术推广服务中心病虫害测报处. 2024 年草地贪夜蛾防控技术方案 [EB/OL]. (2024-03-12) [2024-11-01]. https://hnppi.cn/web/hnzbzj/10058/10059/content_339222.html.
- Sangermani M, Hug I, Sauter N, *et al.* Tad Pili Play a Dynamic Role in *Caulobacter crescentus* Surface Colonization [J]. *mBio*, 2019, 10 (3): e01237-19.
- Shi ZH, Hou YM. Current understanding on the mechanism of the interactions between insects and gut microbiota and its implications in the pest control [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (4) :798-805. [石章红, 侯有明. 昆虫与其肠道菌群互作机理的研究进展及其在害虫管理中的应用前景 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (4) :798-805]
- Sparks AN. A review of the biology of the fall armyworm [J]. *Florida Entomologist*, 1979, 62: 82-87.
- Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, *et al.* Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera:

- Plutellidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1990, 83 (5): 1671-1676.
- Wang RL. Application of biological control techniques for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on corn [J]. *Seed Science*, 2024, 42 (14): 112-114. [王瑞玲. 生物防治技术在玉米草地贪夜蛾防治中的应用 [J]. 种子科技, 2024, 42 (14): 112-114]
- Wen SH, Pang JX, Du GZ, *et al.* Isolation and identification of two *Beauveria bassiana* strains from the infected earwig and their virulence to *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. *Plant Protection*, 2022, 48 (4): 318-323, 362. [温绍海, 庞继鑫, 杜广祖, 等. 2株感染蠋蛾的球孢白僵菌的分离鉴定及对草地贪夜蛾的毒力 [J]. 植物保护, 2022, 48 (4): 318-323, 362]
- Wu KM. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China [J]. *Plant Protection*, 2020, 46 (2): 1-5. [吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略 [J]. 植物保护, 2020, 46 (2): 1-5]
- Yang F, Head GP, Price PA, *et al.* Inheritance of *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2 protein resistance in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76 (11): 3676-3684.
- Yang F, Williams J, Porter P, *et al.* F2 screen for resistance to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa51 protein in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from Texas, USA [J]. *Crop Protection*, 2019, 126: 104915.
- Ye JH, He JC, Wei YH, *et al.* Isolation and characterization of a strain of *Beauveria*, its biological properties and activity against the *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2024, 9 (2): 1-10. [叶峻豪, 何景超, 魏燕华, 等. 1株白僵菌分离鉴定、生物学特性及对草地贪夜蛾幼虫活性研究 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2024, 9 (2): 1-10]
- Zago HB, Siqueira HA, Pereira EJ, *et al.* Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations [J]. *Pest Management Science*, 2014; 70 (3): 488-495.
- Zhang L, Jin MH, Zhang DD, *et al.* Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (2): 19-24, 56. [张磊, 靳明辉, 张丹丹, 等. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定 [J]. 植物保护, 2019, 45 (2): 19-24, 56]
- Zhang LL. The Separation, Screening, Identification and Optimization Offermentation Conditions of *Bacillus thuringiensis* [D]. Hainan: Hainan University Master Thesis, 2014. [张路路. 苏云金芽孢杆菌的分离、筛选、鉴定及发酵条件优化 [D]. 海南: 海南大学硕士论文, 2014]
- Zhang Y, Zhang S, Xu L. The pivotal roles of gut microbiota in insect plant interactions for sustainable pest management [J]. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2023, 9 (1): 66.
- Zou CH, Liu JH, Wu W, *et al.* Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Beauveria* to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its virulence [J]. *Plant Protection*, 2023, 49 (6): 242-246. [邹春华, 刘继辉, 吴伟, 等. 草地贪夜蛾病原白僵菌的分离鉴定及其致病力研究 [J]. 植物保护, 2023, 49 (6): 242-246]