

基于植物代谢组学和昆虫肠道细菌分析光肩星天牛的寄主适应性



谷 奇¹ 贾若峰¹ 李 涵¹ 郭 帅¹ 许 桐¹ 陆鹏飞^{1*} 乔海莉^{2*}

(1. 北京林业大学, 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083;

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 为探究光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 对传统抗性树种白蜡的适应性机制, 利用代谢组学分析不同白蜡品种木质部次生代谢产物, 利用 16S rRNA 测序技术对取食白蜡后的光肩星天牛肠道细菌群落组成进行检测, 并采用 Pearson 方法分析两者的相关性。结果表明, 在洋白蜡 *Fraxinus pennsylvanica* 和中国白蜡 *F. chinensis* 木质部中共筛选出 27 类抗虫性差异代谢产物, 其中黄酮苷、双黄酮及多黄酮、简单酚类、香豆素及其衍生物和木质素苷在中国白蜡中含量较丰富; 而 2-芳基苯并呋喃类黄酮、阿朴啡类、麦角林及其衍生物和有机氮化合物在洋白蜡中占优。光肩星天牛取食洋白蜡和中国白蜡 2 种寄主后肠道细菌群落组成存在明显差异, 优势菌门分别为变形菌门和厚壁菌门; 优势菌属分别为拉乌尔菌属 *Raoultella* (55.79%) 和乳球菌属 *Lactococcus* (57.52%); 筛选到 21 个差异菌属, 其中 13 个菌属在中国白蜡中的相对丰度显著高于洋白蜡。相关性分析结果表明, 尽管类黄酮、简单酚类、香豆素及其衍生物和木质素苷等酚类化合物在中国白蜡中含量更高, 但取食中国白蜡后光肩星天牛肠道内一方面存在优势菌群参与代谢上述物质, 如肠球菌属 *Enterococcus*、拉乌尔菌属对类黄酮和木质素苷的代谢; 另一方面中国白蜡通过一些特异菌属和共有菌属的增殖参与代谢, 如乳杆菌属 *Lactobacillus* 和放线菌属 *Actinomycetes* 对类黄酮、乳球菌属对简单酚类、鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium* 对香豆素及其衍生物、放线菌属和肠球菌属对木质素苷的代谢。生物碱在中国白蜡中的含量低于洋白蜡, 未发现特殊菌属降解该类物质。推测相对于洋白蜡, 取食中国白蜡后光肩星天牛肠道菌群更具特异性和多样化, 可以帮助光肩星天牛快速代谢相关次生物质, 顺利完成其在中国白蜡上的生活史。

关键词: 光肩星天牛; 代谢组学; 肠道微生物; 16S rRNA; 洋白蜡; 中国白蜡

Host adaptability of Asian longhorn beetle *Anoplophora glabripennis* based on metabolomics and insect intestinal bacteria

Gu Qi¹ Jia Ruofeng¹ Li Han¹ Guo Shuai¹ Xu Tong¹ Lu Pengfei^{1*} Qiao Haili^{2*}

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing

100083, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences &

Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to explore the adaptation mechanism of Asian longhorn beetle *Anoplophora glabripennis* to traditional resistant *Fraxinus* spp., metabolomic technology was used to analyze secondary metabolites in the xylem of different *Fraxinus* varieties, and 16S rRNA sequencing technology was used to detect *A. glabripennis* intestinal bacterial community after fed with above-mentioned plants, and the Pearson method was used to analyze the correlation between plant differential metabolites and insect

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0600103), 国家自然科学基金(81774015, 31570643)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: lpengfei224@126.com, qhl193314@sina.com

收稿日期: 2021-03-16

intestinal bacteria. The results showed that a total of 27 different metabolites were screened out from the xylem of *F. pennsylvanica* and *F. chinensis*, among which flavonoid glycosides, biflavonoids and polyflavonoids, simple phenols, coumarins and derivatives, and lignan glycosides were abundant in *F. chinensis*, while 2-arylbenzofuran flavonoids, aporphines, ergoline and derivatives and organonitrogen compounds were abundant in *F. pennsylvanica*. After feeding the two host plants, there were significant differences in intestinal bacterial community of *A. glabripennis*. After feeding *F. pennsylvanica* and *F. chinensis*, it was found that the dominant phyla of intestinal bacteria were Proteobacteria and Firmicutes at phylum level, respectively. At genus level, *Raoultella* (55.79%) and *Lactococcus* (57.52%) were the most dominant bacteria, respectively. Twenty-one different bacterial genera were screened out, of which 13 had significantly higher relative abundance in *F. chinensis*. Correlation analysis results showed that, although flavonoids, simple phenols, coumarin and its derivatives, and lignin glycosides were more abundant in *F. chinensis*, there were dominant bacteria in intestines of *A. glabripennis* involved in metabolism of these substances, including *Enterococcus* and *Raoultella* that could metabolize flavonoids and lignin glycosides. In addition, some specific bacteria emerged or some common bacteria increased after feeding *F. chinensis*, including *Lactobacillus* and *Actinomycetes* that could metabolize flavonoids, *Lactococcus* that could metabolizes simple phenols, *Sphingobacterium* that could metabolize coumarin and derivatives, and *Actinomycetes* and *Enterococcus* that could metabolize lignin glycosides. Alkaloids in *F. chinensis* were less abundant, and there were no more special bacteria to degrade them in intestines after feeding *F. chinensis*. The results indicated that more specific and diversified bacterial community were found in intestines of *A. glabripennis* after feeding *F. chinensis*, which were beneficial for rapid metabolism of related secondary substances and completing its life cycle on *F. chinensis*.

Key words: *Anoplophora glabripennis*; metabonomics; intestinal microbial; 16S rRNA; *Fraxinus pennsylvanica*; *Fraxinus chinensis*

在植物与昆虫的协同进化过程中,植物通过产生次生代谢产物来抵御昆虫为害,而这些植物次生代谢产物受到其自身的严格调控,一般处于关闭或半关闭状态;但当被昆虫取食后植物的防御反应会被激活,启动合成次生代谢产物(杨欣等,2013),包括生物碱类、酚类、黄酮类和一些难消化的纤维素、木质化成分等。这些物质一般不作为昆虫营养物质,但对于昆虫具有化学防御功能(祝愿等,2019)。黄酮类物质可以对多种蛀干害虫和食叶害虫起到降低植物营养摄入、干扰其产卵摄食的抑制作用(邵钰莹,2019)。酚类物质可以抵御病原菌及昆虫侵染,例如酚羟基通常与糖或者糖的衍生物通过苷键结合形成酚苷,以非特异方式影响动物或微生物的分子靶标位点(Wink, 2003);香豆素具有抗微生物及防御植食性昆虫的作用;李会平等(2003)在研究杨属 *Populus* 不同品系中酚酸类物质对光肩星天牛的抗性时发现,酚酸类物质含量越高,对光肩星天牛的抗性越强,并认为可以将酚酸物质含量作为植物对光肩星天牛的抗性指标。生物碱是另外一类植物次生代谢产物,大多数是神经传递或神经受体的阻断剂,具有抵抗昆虫的作用,如小檗碱和莨菪碱等,它们同

时也是植物产生的植保素(王莉等,2007)。

次生代谢产物除了对取食者产生毒害作用外,对取食者肠道内的微生物也有一定的抑制作用。不同的次生代谢产物对肠道菌群的抑制作用不同,如单体黄烷-3-醇能够促进取食者肠道乳酸菌 *Lactobacillus* spp. 的增殖,抑制肠杆菌 *Enterobacter* spp. 和梭状杆菌 *Clostridium* spp.;白藜芦醇可促进乳酸菌和双歧杆菌 *Bifidobacterium* spp. 的生长,抑制大肠杆菌 *E. coli* (Terada et al., 1993; Lee et al., 2006);茶多酚对产气荚膜梭菌 *C. perfringens*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 及副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 都有抑制作用;绿茶 *Thea sinensis* 的甲醇提取物可选择性增强双歧杆菌的生长(Ahn et al., 1990; Hara et al., 1995)。由于次生代谢产物对肠道微生物的抑制作用,定殖在肠道内的微生物通常具有代谢有毒物质的特殊机制:以黄酮化合物为例,肠道菌群不仅可将黄酮类大分子化合物糖苷化降解、酯水解、酰胺水解和去葡萄糖醛酸化,也能对其苷元部分去羟基、去甲氧基、去甲基,对取代的脂肪族进行加氢、 α -氧化、 β -氧化和裂解芳香环,将黄酮代谢为无毒产物,降低次生代谢产物对昆虫的毒害以及对

肠道微生物的抑制作用(杨艳等,2014)。由此可见,植物-昆虫互作是由次生代谢产物和微生物共同介导的一个复杂的生态过程(Vilanova et al.,2016)。

光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 属鞘翅目星天牛属 *Anoplophora*, 该虫主要以幼虫为害植物木质部, 导致树木千疮百孔甚至整株枯死(骆有庆和李建光,1999), 是我国危险性有害生物。目前, 该虫在我国辽宁、河北和山西等29个省(自治区、直辖市)均有分布(李娟等,2013), 并且在美国、加拿大、奥地利、德国乃至法国亦有光肩星天牛为害的报道(Takács et al.,2008)。从21世纪开始, 随着全球经济的一体化发展, 各国之间的交流越来越多, 导致光肩星天牛分布范围逐渐扩大(李浩培等,2020), 且该虫寄主谱十分广泛, 可为害柳属 *Salix*、榆属 *Ulmus* 和杨属等140多种植物(阎雄飞等,2016), 造成严重的经济损失, 这也是其备受关注的的一个重要原因。

白蜡属 *Fraxinus* 树种木质坚韧, 树干挺拔, 常用作行道树, 在园林绿化中有着非常广泛的应用, 是我国重要的经济树种之一(刘国荣,2013)。在对光肩星天牛寄主抗性等级划分的研究中, 白蜡一直被归为光肩星天牛的抗性寄主(王志刚等,2009)。但是, 本课题组近几年在宁夏回族自治区(简称宁夏)固原市的野外调查中发现, 尽管在生境中有光肩星天牛喜食树种旱柳 *S. matsudana*, 但其更倾向于为害中国白蜡 *F. chinensis*; 相反, 在浙江省慈溪市, 光肩星天牛主要为害生境中的金丝垂柳 *S. babylonica* × *S. alba-vitellina*, 而洋白蜡 *F. pennsylvanica* 却完全未受害(未发表数据)。早期也有宁夏黄河沿岸中国白蜡受到光肩星天牛为害的报道(阎雄飞等,2016)。为了探究光肩星天牛对白蜡属植物的适应机制, 本研究利用代谢组学分析2种白蜡木质部次生代谢产物, 利用16S rRNA测序技术对取食2种白蜡后的光肩星天牛肠道微生物群落组成进行检测, 最后分析两者的相关性, 解析光肩星天牛对传统抗性树种白蜡的适应性机制, 以期绿色有效防治光肩星天牛提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 在河北省保定市选取光肩星天牛为害后的旱柳, 砍伐后使用石蜡对木段切口处进行密封, 邮寄至北京林业大学森林保护实验室。从受害木段中取出光肩星天牛幼虫, 并在实验室内测量头壳宽度鉴定幼虫龄期(贺萍和黄竞芳,1992)。挑选

大小以及健康状态一致的3龄幼虫(头壳宽度为2.40~3.16 mm)供试。

供试植物: 分别在浙江省慈溪市和宁夏固原市收集洋白蜡和中国白蜡的健康多年生枝条。所取枝条为主干分支, 距离地面2 m左右, 直径为10~15 cm。带回实验室后, 将采集到的植物枝条洗净, 低温条件下去除韧皮部, 保留木质部供试。

试剂: 色谱级甲醇、乙腈, 德国Merck公司; 98%甲酸和98% L-2-氯-苯丙氨酸, 美国Sigma-Aldrich公司; 细菌DNA提取试剂盒、50×TAE缓冲液, 北京拜尔迪生物技术有限公司; FastPfu聚合酶, 天根生化科技(北京)有限公司; AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒, 美国Axy-Gen公司; NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit, 美国Bioo Scientific公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: LHS-150SC恒温恒湿培养箱, 上海一恒科技有限公司; TissueLyser-24多样品组织研磨机, 上海净信实业发展有限公司; Agilent 1290 Infinity超高效液相色谱仪、Agilent 6545 UHD and Accurate-Mass Q-TOF质谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Thermo Fresco 21离心机、Nanodrop 8000超微量紫外分光光度计和Quantus™ Fluorometer荧光计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DYCP-31DN电泳仪, 北京六一仪器厂; Gel Doc XR+凝胶成像系统、T100™热循环PCR仪, 美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 白蜡木质部整体稳定性分析及成分检测

采用超高效液相色谱-质谱(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)联用仪对洋白蜡和中国白蜡的木质部进行检测。每种白蜡样品称取20 mg于EP管中, 加入500 μL甲醇溶液(含5 μg/mL L-2-氯-苯丙氨酸作为内标), 在50 Hz下匀浆4 min, 涡旋2 min, 于4℃下以12 000 r/min离心10 min, 取上清液检测。同时取等量的各样本上清液混合后作为质控样本。LC-MS联用仪中色谱柱为Waters X Select R HSS T3柱(填充物粒径2.5 μm, 长100 mm, 内径2.1 mm); 流动相A为水(含0.1%甲酸), 流动相B为乙腈(含0.1%甲酸); 流速为0.35 mL/min; 柱温为40℃; 进样量为正模式1 μL、负模式2 μL; 优化的色谱梯度为0~2 min, 5%流动相B; 2~10 min, 5%~95%流动相B; 10~15 min, 95%流动相B; 进样时间间隔5 min, 用于平衡系统。质谱使用正离子模式结合负离子模式, 优化后的参数: 毛细管电压为3.5 kV; 干燥气流为10 L/min; 气体温度为325℃; 喷雾器压

力为 137.9 kPa;裂解电压为 120 V;锥孔电压为 45 V;质谱质核比的采集范围为 50~3 000。

使用仪器自带 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.08.00 软件将测得的原始数据转换成通用格式(mz.data);在 R 4.0.3 软件平台使用 XCMS 程序包进行色谱峰的识别、保留时间的校正以及自动积分等预处理;然后进行内标归一化和重量归一化处理,得到包含样品名、质核比、色谱峰面积的可视化矩阵;在进行多元统计分析时,将编辑后的数据矩阵导入 Simca-P 14.1 软件进行中心化和 Pareto 标度化;使用 R 4.0.3 软件完成主成分分析(principal component analysis, PCA)和对质控样本聚集程度的考察,确保能可靠反映各组之间的最真实差异,并剔除离群值;用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)筛选差异代谢产物并构建模型;计算模型的解释率 R^2 及预测率 Q^2 ,并通过响应排序检验评估模型的可行性;采用 OPLS-DA 模型的 VIP(variable importance in the projection)值(阈值 ≥ 1),并结合独立样本 T 检验法筛选抗虫性差异代谢产物;通过精确分子量 HMDB 在线数据库进行匹配,对差异代谢产物进行定性。

1.2.2 取食白蜡后光肩星天牛肠道细菌 DNA 测序

挑选洋白蜡和中国白蜡的健康枝条,截成 5 cm 长的小木段,去除韧皮部后置于 5 mL 离心管中。饲喂前将获得的所有 3 龄光肩星天牛幼虫饥饿 24 h 后,随机分为 2 组,将幼虫放入装有白蜡木段的离心管中,在温度 27~30℃、相对湿度 40%~60%、全黑暗的恒温恒湿培养箱中饲养。白蜡枝条每 2 d 更换 1 次,连续饲养 1 个月。饲喂结束后,将所有供试幼虫饥饿 24 h,以排空肠道内食物残渣。然后将其放入 75% 乙醇中浸泡 1 min 进行体表消毒;取出虫体用无菌水清洗 3 次,放入盛有磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)的无菌培养皿中,冰浴条件下进行解剖;截取试虫中肠后,放入盛有 1 mL PBS 的无菌离心管中,迅速研磨,得到肠道匀浆液。

使用细菌 DNA 提取试剂盒参照说明书提取取食 2 种白蜡木质部后光肩星天牛 3 龄幼虫肠道细菌总 DNA。以取食同一寄主的 10 头幼虫为 1 组,重复 3 组。将提取的 DNA 样本采用引物 338F(5'-ACT-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增,引物委托上海美吉生物医药科技有限公司合成。20 μ L 反应体系:5 $\times$ Fast-

Pfu 缓冲液 4 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L、FastPfu 聚合酶 0.4 μ L、5 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L、10 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L,补充 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应程序:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,75℃延伸 45 s,循环 27 次;72℃终延伸 10 min,4℃时取 PCR 产物,并经 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,回收目的产物,利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化,采用 Tris-HCl 缓冲液洗脱、2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,经 Quantus™ Fluorometer 凝胶成像系统对回收产物进行检测定量。最后使用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 构建文库,委托上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.2.3 Illumina Miseq 测序数据处理及比对

将 1.2.2 测序所得原始序列利用 Fastp 0.19.6 软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)进行质量控制;使用 FLASH 在线程序(<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml>)进行 pair-end 双端序列拼接;用 Uparse 7.0.1090 软件(<http://www.drive5.com/usearch/>)按照 97% 相似性对序列进行分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类并去除嵌合体;使用 RDP Classifier 2.11 软件(<https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)对每条序列进行物种分类学注释,比对 16S rRNA Silva 数据库(<http://www.arb-silva.de>),在门、属水平上统计各昆虫肠道样品中的细菌组成,设置比对阈值为 70%;基于物种分类学信息,使用 R 4.0.3 软件绘制群落柱状图,并进行统计分析。

1.2.4 次生代谢产物与光肩星天牛肠道细菌相关性分析

应用 Pearson 相关性分析法分别对 2 种白蜡中差异代谢产物(累计 VIP 大于 10 和相对含量比大于 1)与取食这 2 种白蜡后光肩星天牛肠道细菌(相对丰度大于 0.02%)进行相关性分析。

1.3 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析,应用独立样本 T 检验法对植物次生代谢产物的相对含量进行差异显著性检验,应用卡方检验法对光肩星天牛肠道微生物相对丰度进行差异显著性检验。

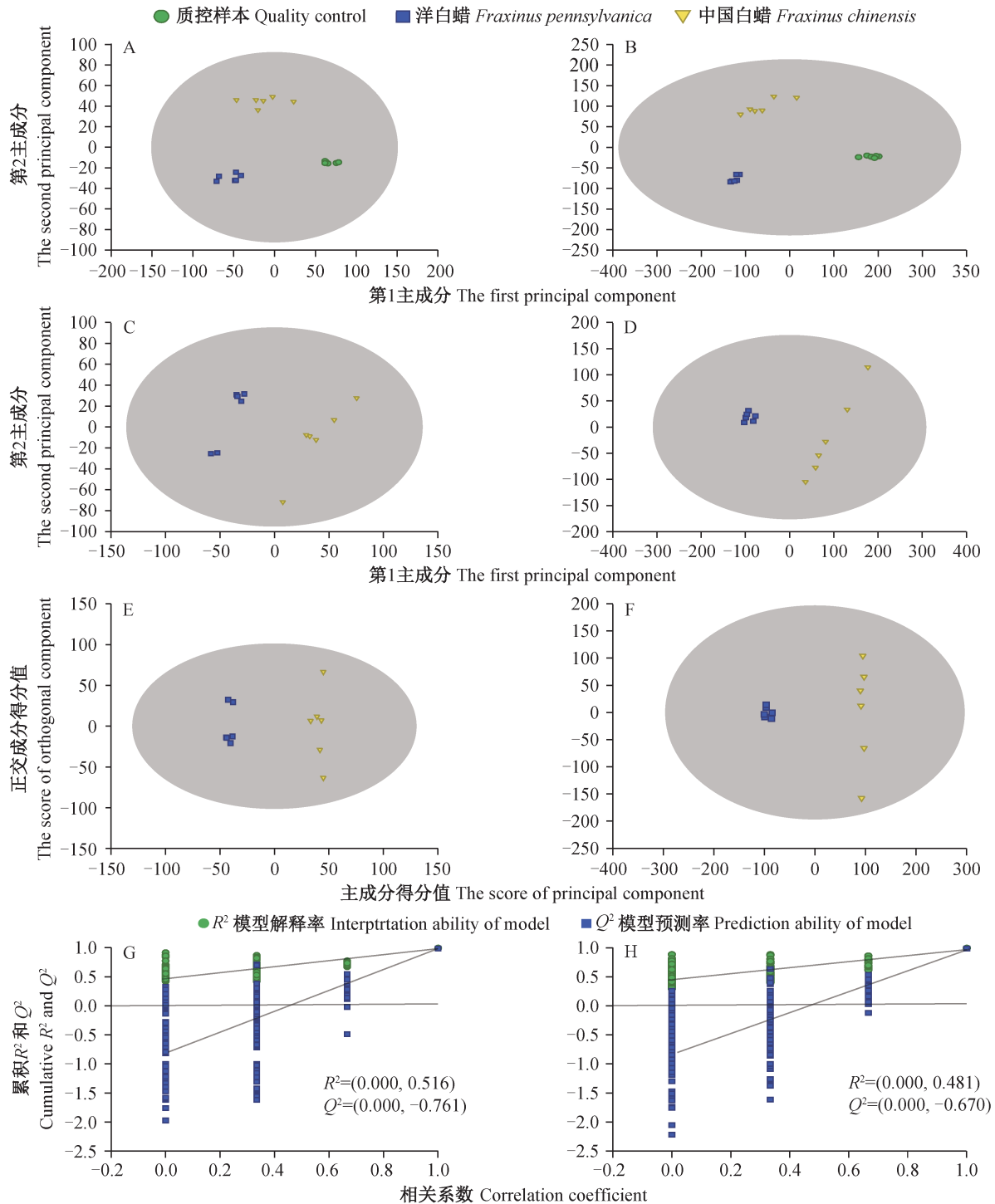
2 结果与分析

2.1 洋白蜡与中国白蜡代谢组学检测结果

2.1.1 整体主成分分析以及系统稳定性

在 PCA 正离子模式(图 1-A)和负离子模式(图 1-B)下,洋白蜡和中国白蜡木质部样本的分布区别明显,离散程度较小,表明各处理样本间的重复性较好,并且质控样本聚集在一起,其离散度明显低于待

分析2组样本的离散度,说明整个分析系统稳定性良好,试验结果可靠性高。



A~B: 洋白蜡和中国白蜡木质部及质控样本的PCA正、负离子模式得分图; C~D: 洋白蜡和中国白蜡木质部样本PCA正、负离子模式得分图; E~F: 洋白蜡和中国白蜡木质部样本OPLS-DA正、负离子模式得分图; G~H: 洋白蜡和中国白蜡木质部样本OPLS-DA模型的正、负离子模式排列测试图。A~B: PCA positive ion mode scores and negative ion mode scores for the samples from *Fraxinus pennsylvanica*, *F. chinensis* xylem and quality control; C~D: PCA positive ion mode scores and negative ion mode scores for xylem samples from *F. pennsylvanica* and *F. chinensis*; E~F: OPLS-DA positive ion mode scores and negative ion mode scores for xylem samples from *F. pennsylvanica* and *F. chinensis*; G~H: positive ion pattern arrangement test diagram and negative ion pattern arrangement test diagram of OPLS-DA model for xylem samples from *F. pennsylvanica* and *F. chinensis*.

图1 系统稳定性考察以及洋白蜡与中国白蜡木质部的主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

Fig. 1 Systematic stability investigation, PCA and OPLS-DA analysis of xylem between *Fraxinus pennsylvanica* and *F. chinensis*

对洋白蜡和中国白蜡样本的PCA和OPLS-DA结果表明,PCA得分图中正离子模式(图1-C)和负离子模式(图1-D)呈现出组间分离趋势,表明2组样品中代谢产物存在明显差异。OPLS-DA结果表明,正离子模式下模型的解释率 R^2 为0.993,预测率 Q^2 为0.984(图1-E);负离子模式下模型的解释率 R^2 为0.997,预测率 Q^2 为0.988(图1-F);2种模式下模型的解释率 R^2 和预测率 Q^2 均大于0.4,表明OPLS-DA模型可以很好地解释洋白蜡和中国白蜡木质部样本间次生代谢产物的差异。

对OPLS-DA模型进行200次的响应排序检验来衡量其是否存在过拟合现象,结果表明,直线斜率较大,模型可靠,不存在过拟合现象,可用于差异代

谢产物的判定与筛选(图1-G~H)。

2.1.2 洋白蜡和中国白蜡中抗虫性差异代谢产物分析

通过对差异代谢产物的筛选和鉴定共得到27类88种抗虫性代谢产物(表1)。统计27类差异代谢产物的累计VIP值,其中,累计VIP值大于10的类别分别是黄酮苷、双黄酮及多黄酮、简单酚类、香豆素及其衍生物和木质素苷,以上物质在洋白蜡和中国白蜡间的差异贡献率较大。对这2组样本中各代谢产物的相对含量比值进行分析,发现仅2-芳基苯并呋喃类黄酮、有机氮化合物、阿朴啡类和麦角灵及其衍生物的相对含量比值大于1,即在洋白蜡中的相对含量大于中国白蜡的;其余物质的相对含量比值均小于1。

表1 洋白蜡和中国白蜡中抗虫性相关代谢产物分类统计表

Table 1 Classification of metabolites related to insect resistance in *Fraxinus pennsylvanica* and *F. chinensis*

物质类别 Category		种类数 No. of species	累计VIP Accumulated VIP	在洋白蜡/中国白蜡中相对含量比 Relative content ratio of <i>F. pennsylvanica</i> / <i>F. chinensis</i>
黄酮类 Flavonoids	2-芳基苯并呋喃类黄酮 2-arylbenzofuran flavonoid	1	1.240	3.100
	黄酮苷 Flavonoid glycoside	13	18.104	0.802
	双黄酮及多黄酮 Phenylpropanoid and polyketide	3	10.250	0.417
	黄碱素 Flavone	5	7.352	0.545
	新黄酮 Neoflavonoid	1	2.132	0.126
	异黄酮 Isoflavonoid	4	5.594	0.208
酚类(除黄酮类) Phenols (except flavonoids)	简单酚类 Simple phenols	8	12.248	0.562
	肉桂酸及其衍生物 Cinnamic acid and derivatives	4	5.889	0.796
	香豆素及其衍生物 Coumarin and derivatives	12	33.460	0.583
	异香豆素及其衍生物 Isocoumarin and derivatives	1	1.019	0.286
有机氮化合物 Organonitrogen compound	木质素苷 Lignan glycoside	7	14.795	0.459
		1	2.880	3.771
	萜类化合物 Terpenoids	3	4.420	0.050
	二萜 Diterpenoid	3	4.200	0.390
生物碱 Alkaloid	三萜 Triterpenoid	4	7.800	0.185
	阿朴啡类 Aporphines	1	2.645	10.963
	麦角灵及其衍生物 Ergoline and derivatives	1	1.396	3.380
	Aquifoliunine E-III	1	1.467	0.518
	吗啡 Morphinan	2	2.653	0.033
	苯并菲啶生物碱 Benzophenanthridine alkaloid	1	1.172	0.529
有机杂环化合物 Organoheterocyclic compound	吡啶及其衍生物 Pyridine and derivatives	1	2.044	0.060
	氮杂环化合物 Azacyclic compound	1	2.123	0.006
	叠氮癸烷衍生物 Azaspirodecane derivatives	2	3.022	0.195
	蝶啶及其衍生物 Pteridine and derivatives	1	1.021	0.027
	异喹啉及其衍生物 Isoquinoline and derivatives	1	1.280	0.022
	杂芳族化合物 Heteroaromatic compound	3	4.648	0.379
吲哚及其衍生物 Indole and derivatives		3	9.772	0.614

VIP表示该物质在组间差异的贡献率,VIP值越大,表示贡献率越大。VIP indicates the contribution rate of the substance to the difference between groups. The higher the VIP value, the higher the contribution rate.

2.2 取食洋白蜡和中国白蜡后肠道微生物检测结果

2.2.1 肠道细菌测序结果分析

对光肩星天牛肠道细菌测序结果进行质控后,以洋白蜡和中国白蜡为食的3龄幼虫肠道内分别获得48 551条和39 649条有效序列,共88 220条。按

照97%相似性对所有非重复有效序列进行OTU聚类后,共获得44个OTU,分别注释到6门7纲20目31科40属42种。中国白蜡样本中的物种群落组成数量均高于洋白蜡样本(表2)。

表2 光肩星天牛3龄幼虫肠道细菌 OTU 物种分类统计

Table 2 Species taxonomic statistics of OTU of intestinal bacteria in the 3rd-instar larvae of <i>Anoplophora glabripennis</i>							
样品名 Sample name	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	序列 Sequence
洋白蜡 <i>F. pennsylvanica</i>	4	5	11	17	22	24	48 551
中国白蜡 <i>F. chinensis</i>	6	7	19	25	31	31	39 649

根据OTU聚类分析结果,对取食不同白蜡的光肩星天牛肠道样品中共有和特有的OTU进行分析,发现洋白蜡中有28个OTU,中国白蜡中有33个OTU,2组样本中共有的OTU数量为17个,表明2组样本在物种分类学水平上具有一定的相似性。以洋白蜡为食的幼虫肠道内含有11个特有OTU,在属水平上对其进行分析,特有OTU分别属于不动杆菌属 *Acinetobacter*、短状杆菌属 *Brachy bacterium*、红球菌属 *Rhodococcus*、棒状杆菌属 *Corynebacterium*、纤维单胞菌属 *Cellulomonas*、交替红杆菌属 *Altererythrobacter*、劳尔氏菌属 *Ralstonia*、谷氨酸杆菌属 *Glutamicibacter* 和 *Aureimonas*。以中国白蜡为食的幼虫肠道内含有16个特有OTU,在属水平上对其进行分

析,特有OTU分别属于戴沃斯菌属 *Devosia*、Norank chloroplast、*Nakamurella*、*Propionificella*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、乳球菌属 *Lactococcus*、Unclassified Micrococcales、*Gibbsiella*、Unclassified bacteria、*Fluviicola*、藤黄单孢菌属 *Luteimonas*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、*Kaistia* 和放线菌属 *Actinomyces*。

2.2.2 肠道微生物群落组成分析

根据OTU注释结果,分别在门、属水平上对光肩星天牛肠道微生物群落组成与结构进行分析,在门水平上,变形菌门为取食洋白蜡幼虫肠道微生物群落中的优势菌门,相对丰度为99.14%,厚壁菌门为取食中国白蜡幼虫肠道微生物群落中的优势菌门,相对丰度为62.02%(表3)。

表3 取食2种寄主后光肩星天牛肠道细菌在门水平上的物种相对丰度

Table 3 Relative abundances of intestinal bacteria in <i>Anoplophora glabripennis</i> at phylum level after feeding two host plants		
细菌门 Phylum	在洋白蜡中的相对丰度 Relative abundance in <i>F. pennsylvanica</i> /%	在中国白蜡中的相对丰度 Relative abundance in <i>F. chinensis</i> /%
变形菌门 Proteobacteria	99.14	37.63
厚壁菌门 Firmicutes	0.74	62.02
放线菌门 Actinobacteria	0.12	0.27
蓝藻门 Cyanobacteria	<0.01	<0.01
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.01	0.07
未确定细菌 Unclassified bacteria	0.00	0.01

在属水平上,取食洋白蜡的幼虫肠道微生物群落中优势菌属为拉乌尔菌属 *Raoultella*、肠杆菌科未确定属 Unclassified Enterobacteriaceae、肠杆菌属 *Enterobacter* 和肠球菌属 *Enterococcus*,相对丰度分别为55.79%、27.09%、16.10%和0.74%;取食中国白蜡的幼虫肠道微生物群落中优势菌属为乳球菌属、拉乌尔菌属、肠球菌属、肠杆菌科未确定属和肠杆菌属,相对丰度分别为57.52%、35.60%、4.48%、0.93%和0.64%。2组样品中共有的优势菌属为拉乌尔菌属、肠杆菌科未确定属、肠杆菌属和肠球菌属。相对

丰度排前3位的菌属在取食洋白蜡的幼虫肠道微生物群落中的含量要高于取食中国白蜡的幼虫肠道微生物群落中的含量;肠球菌属则在取食中国白蜡的幼虫肠道微生物群落中含量较高。此外,取食中国白蜡的幼虫肠道微生物群落中的优势菌乳球菌属未在取食洋白蜡的幼虫肠道内检测到(表4)。

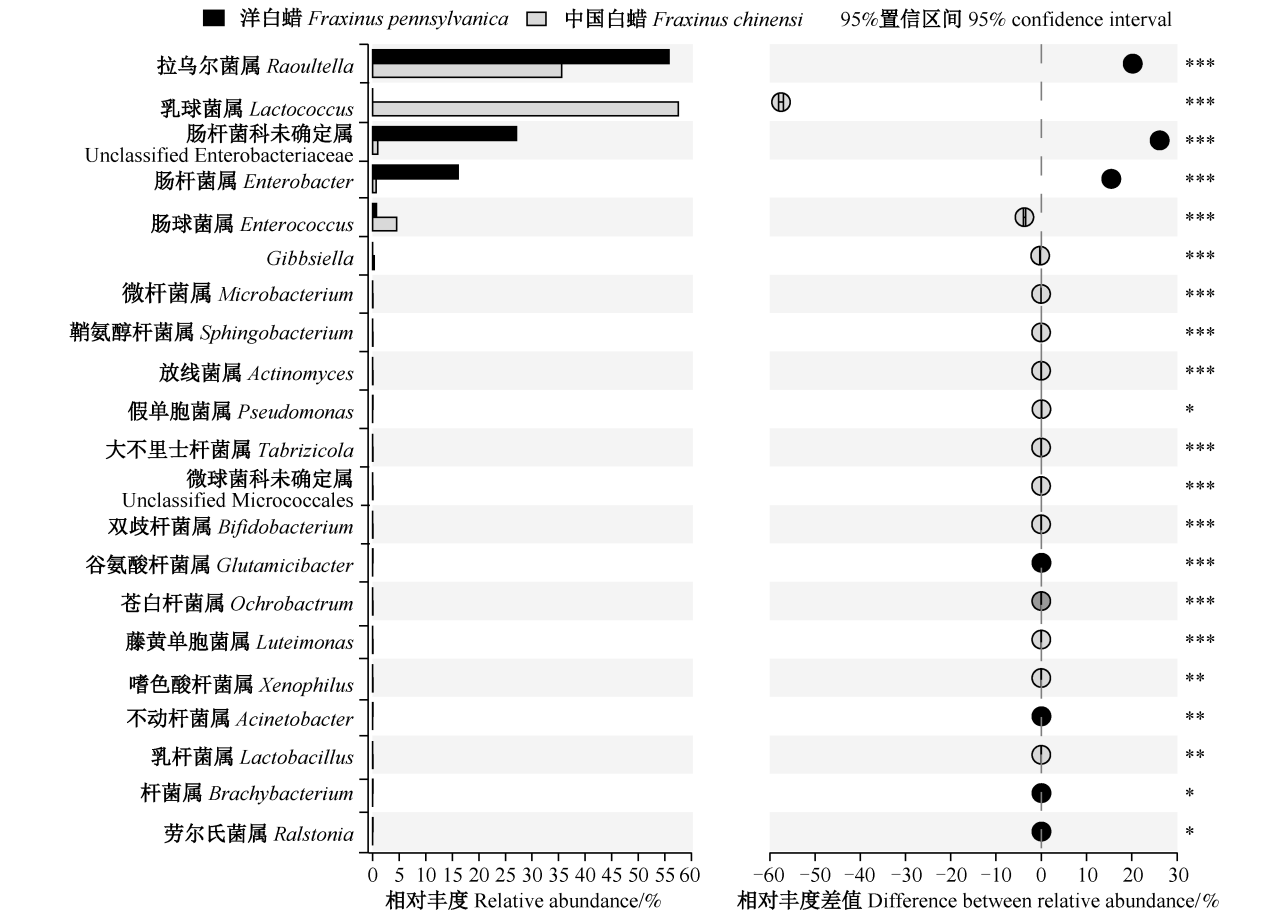
2.2.3 差异菌属筛选结果

为了进一步分析取食洋白蜡与中国白蜡后光肩星天牛肠道内细菌变化情况,使用卡方检验法在属分类水平对相对丰富高于0.01%的肠道细菌进行差

异菌属的筛选,共得到21个差异细菌(图2)。其中13个菌属在取食中国白蜡的光肩星天牛幼虫肠道微生物群落中的相对丰度显著高于取食洋白蜡的幼虫,9个菌属在取食洋白蜡的幼虫肠道微生物群落中的相对丰度显著高于取食中国白蜡的幼虫。

表4 取食2种寄主后光肩星天牛肠道细菌在属水平上的物种相对丰度

Table 4 Relative abundances of intestinal bacteria in <i>Anoplophora glabripennis</i> at genus level after feeding two host plants					
细菌属名 Genus	在洋白蜡中的 相对丰度 Relative abundance in <i>F. pennsylvanica</i> /%	在中国白蜡中的 相对丰度 Relative abundance in <i>F. chinensis</i> /%	细菌属名 Genus	在洋白蜡中的 相对丰度 Relative abundance in <i>F. pennsylvanica</i> /%	在中国白蜡中的 相对丰度 Relative abundance in <i>F. chinensis</i> /%
拉乌尔菌属 <i>Raoultella</i>	55.79	35.60	双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	0.00	0.04
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	0.00	57.52	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	<0.01	0.06
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	0.74	4.48	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	0.00	0.02
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	16.10	0.64	大不里士杆菌属 <i>Tabrizicola</i>	<0.01	0.04
肠杆菌科未确定属	27.09	0.93	微球菌科未确定属	0.00	0.04
Unclassified Enterobacteriaceae			Unclassified Micrococcales		
<i>Gibbsiella</i>	0.00	0.27	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	<0.01	0.03
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.04	<0.01	藤黄单胞菌属 <i>Luteimonas</i>	0.00	0.02
放线菌属 <i>Actinomyces</i>	0.00	0.06	甲基球形菌属 <i>Methylopila</i>	0.02	<0.01
谷氨酸杆菌属 <i>Glutamicibacter</i>	0.03	0.00	短状杆菌属 <i>Brachybacterium</i>	0.02	0.00
戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	0.02	<0.01	劳尔氏菌属 <i>Ralstonia</i>	0.02	0.00
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	0.02	<0.01	嗜色酸杆菌属 <i>Xenophilus</i>	<0.01	0.02
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	<0.01	0.07	其他 other	0.03	0.03



*: 0.01<P≤0.05; **: 0.001<P≤0.01; ***: P≤0.001.

图2 属水平上取食2种寄主后光肩星天牛肠道微生物的差异菌属

Fig. 2 Different intestinal microflora in *Anoplophora glabripennis* at genus level after feeding two host plants

以洋白蜡为食的光肩星天牛幼虫肠道中的特异菌属为谷氨酸杆菌属、短状杆菌属和劳尔氏菌属;较以中国白蜡为食的光肩星天牛幼虫肠道中相对丰度显著增加的菌属为拉乌尔菌属、肠杆菌科未确定属、肠杆菌属、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和不动杆菌属。

以中国白蜡为食的光肩星天牛幼虫肠道中的特异菌属为乳球菌属、*Gibbsiella*、放线菌属、双歧杆菌属、乳杆菌属、微球菌科未确定属 *Unclassified Micrococcales* 和藤黄单胞菌属;较以洋白蜡为食的光肩星天牛幼虫肠道中的相对丰度显著增加的菌属为肠球菌属、微杆菌属 *Microbacterium*、鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium*、大不里士杆菌属 *Tabrizicola*、苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 和嗜色酸杆菌属 *Xenophilus*。

2.3 白蜡差异代谢产物与肠道细菌的相关性分析

相关性分析结果表明,黄酮苷在洋白蜡中与肠球菌属、甲基球形菌属 *Methylopila* 呈正相关;在中国白蜡中与拉乌尔菌属呈显著正相关($P<0.05$),与乳球菌属呈显著负相关($P<0.05$),与肠球菌属、放线菌属呈正相关。双黄酮与多黄酮在洋白蜡中与肠球

菌属呈极显著正相关($P<0.01$);在中国白蜡中与拉乌尔菌属、肠球菌属和放线菌属呈正相关。2-芳基苯并呋喃类黄酮在洋白蜡中与肠杆菌属呈显著负相关($P<0.05$),与拉乌尔菌属呈正相关;在中国白蜡中与肠杆菌属呈正相关。简单酚类在洋白蜡中与拉乌尔菌属呈显著正相关($P<0.05$);在中国白蜡中与乳球菌属呈极显著正相关($P<0.01$)。香豆素及其衍生物在洋白蜡中与肠道细菌相关性均较低;在中国白蜡中与鞘氨醇杆菌属呈正相关。木质素苷在洋白蜡中与肠球菌属、甲基球形菌属和劳尔氏菌属呈正相关;在中国白蜡中与拉乌尔菌属和肠球菌属呈显著正相关($P<0.05$),与放线菌属呈正相关。生物碱阿朴啡类在洋白蜡中与假单胞菌属呈正相关;在中国白蜡中与肠道细菌相关性均较低。麦角灵及其衍生物在洋白蜡中与肠杆菌属和不动杆菌属呈正相关;在中国白蜡中与乳球菌属呈正相关。有机氮化合物在洋白蜡中与拉乌尔菌属呈极显著正相关($P<0.01$),与肠球菌属和不动杆菌属呈正相关;在中国白蜡中与拉乌尔菌属、肠球菌属和放线菌属呈正相关(表5~6)。

表5 洋白蜡次生代谢产物与取食其光肩星天牛肠道细菌的相关系数

Table 5 Correlation coefficients between *Fraxinus pennsylvanica* secondary metabolites and *Anoplophora glabripennis* intestinal bacteria after fed with *F. pennsylvanica*

肠道细菌 Intestinal bacteria	黄酮类 Flavonoids			酚类(除黄酮类) Phenols (except flavonoids)			生物碱 Alkaloid		有机氮化合物 Organonitrogen compound
	黄酮苷 Flavone	双黄酮及多黄酮 Phenylpropanoid and polyketide	2-芳基苯并呋喃类黄酮 2-arylbenzofuran flavonoid	简单酚类 Simple phenols	香豆素及其衍生物 Coumarin and derivatives	木质素苷 Lignan glycoside	阿朴啡类 Aporphines	麦角灵及其衍生物 Ergoline and derivatives	
拉乌尔菌属 <i>Raoultella</i>	0.13	0.56	0.65	0.84*	-0.10	0.20	-0.10	-0.30	0.94**
肠杆菌科未确定属 <i>Unclassified Enterobacteriaceae</i>	0.42	-0.08	0.28	0.31	0.44	-0.30	0.30	0.26	0.37
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	-0.05	-0.33	-0.89*	-0.60	0.41	0.01	-0.50	0.67	-0.40
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	0.61	0.96**	0.17	0.47	-0.10	0.68	-0.10	-0.40	0.75
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	-0.10	-0.56	0.43	-0.10	0.15	-0.30	0.75	-0.40	-0.30
谷氨酸杆菌属 <i>Glutamicibacter</i>	0.51	0.67	0.48	0.34	0.10	0.47	0.36	-0.80	0.45
戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	0.05	0.58	-0.50	0.01	0.02	0.44	-0.20	0.29	0.31
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	0.57	0.49	-0.10	0.45	0.11	-0.10	-0.60	0.62	0.62
甲基球形菌属 <i>Methylopila</i>	0.70	0.39	-0.70	-0.30	0.09	0.65	-0.10	0.09	0.05
短状杆菌属 <i>Brachybacterium</i>	0.71	0.16	-0.60	-0.40	0.23	0.46	0.09	0.20	0.01
劳尔氏菌属 <i>Ralstonia</i>	0.68	0.31	-0.70	-0.40	0.11	0.65	-0.70	-0.01	0.09

*和**分别表示经 Pearson 相关性分析法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平(双侧)显著相关。* or ** indicates significant correlation at $P<0.05$ or $P<0.01$ level (bilateral) by Pearson correlation analysis.

表6 中国白蜡次生代谢产物与取食其光肩星天牛肠道细菌的相关系数

Table 6 Correlation coefficients between *Fraxinus chinensis* secondary metabolites and *Anoplophora glabripennis* intestinal bacteria after fed with *F. chinensis*

肠道细菌 Intestinal bacteria	黄酮类 Flavonoids			酚类(除黄酮类) Phenols (except flavonoids)			生物碱 Alkaloid		有机氮 化合物 Organoni- trogen compound
	黄酮苷 Flavone	双黄酮 及多黄酮 Phenylpro- panoid and polyketide	2-芳基苯并 呋喃类黄酮 2-arylben- zofuran flavonoid	简单 酚类 Simple phenols	香豆素及其 衍生物 Coumarin and derivatives	木质素苷 Lignan glycoside	阿朴啡类 Aporphines	麦角灵及其 衍生物 Ergoline and derivatives	
拉乌尔菌属 <i>Raoultella</i>	0.86*	0.75	0.27	-0.80	0.43	0.85*	0.47	-0.50	0.77
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	-0.82*	-0.71	0.14	0.96**	-0.50	-0.70	-0.50	0.74	-0.50
肠杆菌科未确定属 Unclassified Enterobacteriaceae	-0.37	-0.48	-0.60	0.01	-0.20	-0.40	0.37	-0.70	-0.60
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	-0.25	-0.26	0.72	0.49	-0.50	-0.10	-0.10	0.35	0.22
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	0.77	0.78	0.39	-0.30	0.56	0.84*	0.13	0.19	0.81
<i>Gibbsiella</i>	0.30	0.42	0.12	0.04	0.38	0.33	-0.30	0.51	0.28
放线菌属 <i>Actinomyces</i>	0.72	0.79	0.43	-0.20	0.36	0.80	0.16	0.23	0.67
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	-0.45	-0.45	-0.70	0.35	-0.20	-0.50	0.41	-0.40	-0.80
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	-0.60	-0.44	-0.20	0.58	-0.50	-0.50	-0.30	0.39	-0.70
鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	-0.01	-0.21	0.00	0.01	0.67	0.05	-0.30	0.24	0.49
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	0.48	0.49	0.43	-0.70	-0.10	0.52	0.20	-0.30	0.41
微球菌科未确定属 Unclassified Micrococcales	0.09	0.25	-0.40	0.03	0.04	0.04	0.03	0.06	-0.30
苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	-0.08	-0.06	0.47	0.58	-0.30	0.10	0.27	0.25	0.17
藤黄单胞菌属 <i>Luteimonas</i>	0.01	0.12	-0.30	0.40	0.00	0.07	0.34	0.06	-0.30

*和**分别表示经 Pearson 相关性分析法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平 (双侧) 显著相关。* or ** indicates significant correlation at $P<0.05$ or $P<0.01$ level (bilateral) by Pearson correlation analysis.

3 讨论

在植物与昆虫的协同进化过程中,植物通过自身产生的防御物质一方面阻碍昆虫取食、产卵,进而影响植食性昆虫的正常生长发育;另一方面,对昆虫肠道内的某些菌群具有抑制作用(雷盼和黄国文, 2014),或者刺激另外一些菌群的增殖(相辉和黄勇平, 2008),改变肠道菌群组成,进一步导致肠道功能发生变化(肖俊松等, 2012; Scully et al., 2018)。这种由肠道微生物所介导的适应性机制在昆虫适应不同寄主植物选择中发挥着重要作用(Meng et al., 2015)。本研究结果表明,洋白蜡和中国白蜡木质部

的次生代谢产物存在显著差异,相应的,取食这2种白蜡后的光肩星天牛幼虫肠道生物群落组成也发生了明显改变,白蜡中不同种类次生代谢产物与幼虫肠道细菌的互作,在光肩星天牛寄主适应性机制中扮演着重要角色。

本研究通过LC-MS联用仪对洋白蜡和中国白蜡木质部中抗虫性差异代谢产物进行筛选,共得到27类88种差异代谢产物,主要包括黄酮类、酚类、有机氮化合物、萜类、生物碱和有机杂环化合物。可见,洋白蜡和中国白蜡均存在应对昆虫取食为害的防御策略,产生了种类丰富的抗虫性次生代谢产物以抵御光肩星天牛的危害。在这些差异代谢产物

中,除了2-芳基苯并呋喃类黄酮、有机氮化合物和阿普菲类生物碱在洋白蜡中含量较高外(相对含量比大于1),其余物质的含量均在中国白蜡中更高,且黄酮苷、双黄酮及多黄酮、简单酚类、香豆素及衍生物和木质素苷差异最为显著(累计VIP值均大于10)。以上8类物质可归类为黄酮类化合物、酚类化合物、生物碱和有机氮化合物,这是普遍公认的抗虫性次生代谢产物,可影响昆虫消化能力,抑制昆虫的繁殖(李俊年和刘季科,2000),并且具有明显的毒杀作用(Belmain et al., 2012)。进一步对比抗性物质的种类及含量,相比于洋白蜡,中国白蜡木质部含有更丰富的抗虫性物质,但在野外条件下并未缓解光肩星天牛的为害程度,究其原因可能是光肩星天牛肠道内的细菌参与了相关抗虫性物质的代谢过程,进而降低了抗虫性物质对宿主的毒害作用。

黄酮类化合物是存在于植物中的一种重要抗虫物质,同时也具有一定的抑菌作用。雷盼和黄国文(2014)研究结果表明,从植物中提取出来的黄酮类物质对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有一定的抑制活性,并且黄酮对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的强烈抑制作用分别是绿原酸的2倍和4倍。反之,肠道菌群可以对黄酮类化合物进行代谢,在取食过程中,黄酮类化合物进入肠道后无法被生命体直接代谢消化,但可以通过肠道菌群生物转化分解为简单酚酸后被吸收或排泄(Serra et al., 2012)。基于黄酮类物质的抑菌作用以及肠道菌群对黄酮类化合物的代谢,当昆虫摄入较多的黄酮类物质后会对肠道微生物群落进行选择,尤其会保留那些具有代谢该类化合物的细菌种类。

本研究通过分析2种白蜡木质部次生代谢产物与天牛取食该寄主后肠道细菌的相关性发现,2种白蜡中黄酮类物质均与肠球菌属和拉乌尔菌属密切相关,表明肠球菌属和拉乌尔菌属在黄酮类物质代谢过程中发挥着重要作用。目前已有研究证实细菌中的一些种类具有代谢黄酮类物质的能力(Frankenfeld, 2017)。本研究中肠球菌属在种水平上鉴定为酪黄肠球菌 *Enterococcus casseliflavus*, 该菌可以将黄酮类化合物中的黄酮醇进行糖苷发酵,产生甲酸盐、醋酸盐、L-乳酸盐和乙醇(Schneider et al., 1999)。除了发酵过程外,肠球菌属还可以通过开环去甲基和去酮基对黄酮类物质进行进一步代谢(于飞等, 2009)。拉乌尔菌属同肠球菌属一样与黄酮类化合物表现出较强的相关性,因此可能在协助光肩

星天牛代谢黄酮类物的过程中发挥着重要作用。此外,在取食中国白蜡的光肩星天牛幼虫肠道中,乳杆菌属和放线菌属这2种特异细菌与黄酮类物质存在着不同程度的正相关性,表明这2种特异细菌在黄酮类物质代谢过程中发挥着一定作用。乳杆菌属在无氧条件下分泌 β -葡萄糖苷酶,可以协助完成黄酮类化合物的去糖基化,促进黄酮类化合物的代谢转化(Mika et al., 2014)。放线菌属可能与乳杆菌属一样,并不直接参与黄酮类物质的代谢过程,而是对其代谢过程起到了促进作用。

酚类化合物可以阻断细胞膜电子链的传送和氧化磷酸化(肖俊松等, 2012),影响动物或微生物的分子靶标位点(李明等, 2007),进而对宿主产生直接或间接的毒性作用,并且植物多酚在调节肠道内的微生态方面也具有一定的作用(Vendrame et al., 2011; 黄小丹等, 2021)。在本研究中,由于不同白蜡中酚类化合物的种类与含量存在显著差异,导致肠道内参与酚类代谢的微生物种类也相应发生改变。目前只有少量的菌种能将多酚进行生物转化(Cardona et al., 2013),如不动杆菌可以对酚苷进行降解,减轻这些化合物的细胞毒性(Vilanova et al., 2016);双歧杆菌能将一些酚类物质降解成对香豆酸和咖啡酸(杨艳等, 2014)。虽然单一细菌可以实现对酚类物质的转化,但大多情况下是多种肠道微生物共同作用的结果,如大豆苷元在转化为雌马酚的过程中受到了卵形拟杆菌 *Bacteroides ovatus*、产瘤胃球菌 *Ruminococcus productus*、中链球菌 *Streptococcus intermedius*、黏膜乳杆菌 *Lactobacillus mucosae*、粪肠球菌 *Enterococcus faecium* 和大芬戈尔德菌 *Fingoldia magna* 等多种细菌的协同作用(Li et al., 2017)。同样,本研究在相关性分析中发现,以中国白蜡为食的光肩星天牛肠道内的优势细菌和特异细菌与酚类物质表现出不同程度的正相关性,如乳球菌属、鞘氨醇杆菌属、肠球菌属、放线菌属和双歧杆菌属等,其中也包括了一些可以直接代谢酚类物质的细菌。这表明取食中国白蜡后,光肩星天牛幼虫肠道内代谢酚类化合物的细菌种类或者特异性增强,或者更加多样化。肠道内多种细菌的协同作用很可能是光肩星天牛可以在中国白蜡上完成正常生长发育的重要因素。此外,取食中国白蜡后光肩星天牛幼虫肠道内的乳球菌属和乳杆菌属还可以在无氧条件下产生超氧化物歧化酶,并通过发酵作用清除酚类化合物在氧化过程中间接诱导产生的活性氧(Schweigert et

al., 2001), 增加其清除自由基的能力(付良等, 2009)。

生物碱和有机氮化合物均属于含氮化合物, 是植物中一大类具有防御功能的次生代谢产物。许多放线菌和丝状真菌可以通过不同的反应类型实现对含氮化合物的有效转化(刘召明等, 2015)。在本研究中, 洋白蜡中阿朴啡类生物碱、麦角灵及其衍生物以及有机氮化合物的含量高于中国白蜡, 并且在相关性分析中, 阿朴啡类与洋白蜡中的假单胞菌属存在较强的正相关性; 有机氮化合物与肠道优势细菌拉乌尔菌属呈现显著正相关性, 表明这2类细菌可能参与了含氮化合物的代谢过程。已有研究证明假单胞菌属可以实现生物碱的降解(Mason et al., 2016), 例如从土壤中筛选出假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. gsc1182 菌株, 该菌在 48 h 内能降解掉 80% 的咖啡碱(Gokulakrishnan et al., 2007); 栗娜等(2010)发现假单胞菌属的 *P. lute* 对咖啡碱的降解效率甚至达到了 100%。而对拉乌尔菌属更多的研究是其在降低环境污染过程中的作用, 如拉乌尔菌属在污水处理过程中能够独立完成异养硝化和好氧反硝化脱氮过程(颜薇芝等, 2016), 该菌的粗酶液可以有效分解农药多菌灵(王呈玉等, 2012)。由此推测光肩星天牛肠道内的优势细菌拉乌尔菌属可能与昆虫的抗药性和固氮作用有关。与洋白蜡相比, 中国白蜡木质部中阿朴啡类以及有机氮化合物的含量均低于洋白蜡, 且相关性分析中并未发现有肠道细菌与这些化合物表现出较强的相关性, 因此推测取食中国白蜡后光肩星天牛幼虫肠道内没有特殊的菌属来降解这类代谢产物。

综上所述, 基于肠道菌群对不同种类化合物的代谢作用, 当昆虫摄入不同来源的食物后会对肠道微生物群落进行选择, 尤其会保留那些具有代谢某一类化合物的细菌种类。大量具有特定功能的微生物在昆虫肠道内定殖, 并在昆虫与植物的协同进化过程中直接或间接发挥着重要作用。本研究基于代谢组学和高通量测序技术对植物的次生代谢产物和肠道微生物群落组成结构进行整合, 分析了肠道微生物群落在协助宿主代谢解毒并适应植物防御机制过程中发挥的功能。通过对植物与肠道微生物之间的关系进行研究, 加深由次生代谢产物和微生物共同介导的复杂生态过程的理解, 为绿色有效防治光肩星天牛提供新的思路与角度。

参 考 文 献 (References)

Ahn YJ, Sakanaka S, Kim MJ, Kawamura T, Fujisawa T, Mitsuoka T.

1990. Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3(6): 335–338
- Belmain SR, Amoah BA, Nyirenda SP, Kamanula JF, Stevenson PC. 2012. Highly variable insect control efficacy of *Tephrosia vogelii* chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40): 10055–10063
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8): 1415–1422
- Fu L, Liu F, Huo GC. 2009. Research advance of *Lactococcus lactis* of oxidative stress resistance. *Journal of Northeast Agricultural University*, 40(6): 132–136 (in Chinese) [付良, 刘飞, 霍贵成. 2009. 乳酸乳球菌抗氧化的研究进展. *东北农业大学学报*, 40(6): 132–136]
- Frankenfeld CL. 2017. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1): DOI: 10.1002/mnfr.201500900
- Gokulakrishnan S, Chandraraj K, Gummadi SN. 2007. A preliminary study of caffeine degradation by *Pseudomonas* sp. GSC 1182. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3): 346–350
- Hara H, Orita N, Hatano S, Ichikawa H, Hara Y, Matsumoto N, Kimura Y, Terada A, Mitsuoka T. 1995. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57(1): 45–49
- He P, Huang JF. 1992. Laboratory rearing of *Anoplophora glabripennis*. *Journal of Beijing Forestry University*, 14(2): 61–67 (in Chinese) [贺萍, 黄竞芳. 1992. 光肩星天牛的人工饲养. *北京林业大学学报*, 14(2): 61–67]
- Huang XD, Chen MY, Huang WJ, Zhang MW, Yan SJ. 2021. Progress based on metabolomics: plant polyphenols and their gut health benefit. *Biotechnology Bulletin*, 37(1): 123–136 (in Chinese) [黄小丹, 陈梦雨, 黄文洁, 张名位, 晏石娟. 2021. 基于代谢组学的植物多酚及其肠道健康效应研究进展. *生物技术通报*, 37(1): 123–136]
- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9): 876–884
- Lei P, Huang GW. 2014. Research progress on the types and application of antibacterial substances in plants. *Journal of Hunan University of Science and Engineering*, 35(10): 50–52 (in Chinese) [雷盼, 黄国文. 2014. 植物中抑菌物质种类和应用的研究进展. *湖南科技学院学报*, 35(10): 50–52]
- Li HP, Lyu F, Bi YG, Wang ZG. 2020. Reviews on the serious wood-boring pest *Anoplophora glabripennis* in forestry of China. *Forestry and Ecological Sciences*, 35(1): 1–9 (in Chinese) [李浩培, 吕飞, 毕拥国, 王志刚. 2020. 我国林业重要蛀干害虫光肩星天牛研究进展. *林业与生态科学*, 35(1): 1–9]
- Li HP, Wang ZG, Yang MS, Zhang YG, Huang DZ, Zhang SH. 2003. The relation between tannin and phenol constituents and resistance to *Anoplophora glabripennis* of various poplar tree spe-

- cies. Journal of Agricultural University of Hebei, 26(1): 36–39 (in Chinese) [李会平, 王志刚, 杨敏生, 张彦广, 黄大庄, 张世红. 2003. 杨树单宁与酚类物质种类及含量与光肩星天牛危害之间关系的研究. 河北农业大学学报, 26(1): 36–39]
- Li J, Cui YS, Song YS, Cheng XC. 2013. Characteristics of new list of quarantine and dangerous pests in China. Forest Pest and Disease, 32(5): 42–47 (in Chinese) [李娟, 崔永三, 宋玉双, 程相称. 2013. 我国林业检疫性和危险性有害生物新名单的特点. 中国森林病虫, 32(5): 42–47]
- Li JN, Liu JK. 2000. Plant chemical defenses and the adaptive strategies of herbivorous mammals. Acta Theriologica Sinica, 20(3): 225–232 (in Chinese) [李俊年, 刘季科. 2000. 植物化学防卫与植食性哺乳动物的适应对策. 兽类学报, 20(3): 225–232]
- Li M, Zeng RS, Luo SM. 2007. Secondary metabolites related with plant resistance against pathogenic microorganisms and insect pests. Chinese Journal of Biological Control, 23(3): 269–273 (in Chinese) [李明, 曾任森, 骆世明. 2007. 次生代谢产物在植物抵抗病虫害中的作用. 中国生物防治, 23(3): 269–273]
- Li N, Ji BP, Li B, Wu W. 2010. Screening and identification of a *Pseudomonas lutea* strain capable of degrading caffeine. Food Science, 31(21): 218–221 (in Chinese) [栗娜, 籍保平, 李博, 吴薇. 2010. 可降解咖啡碱菌株的筛选与鉴定. 食品科学, 31(21): 218–221]
- Li SY, Li XP, Shpigelman A, Lorenzo JM, Montesano D, Barba FJ. 2017. Direct and indirect measurements of enhanced phenolic bioavailability from litchi pericarp procyanidins by *Lactobacillus casei*-01. Food & Function, 8(8): 2760–2770
- Liu GR. 2013. Research progress on landscape architecture of *Fraxinus* in China. Chinese Horticulture Abstracts, 29(12): 73–74 (in Chinese) [刘国荣. 2013. 我国白蜡属植物的园林研究进展. 中国园艺文摘, 29(12): 73–74]
- Liu ZM, Zhu YQ, Wei XQ. 2015. Advances in biotransformation of alkaloids by microorganisms. Biotech World, 12(8): 189 (in Chinese) [刘召明, 朱雅琪, 魏雪琴. 2015. 微生物转化生物碱的研究进展. 生物技术世界, 12(8): 189]
- Luo YQ, Li JG. 1999. Bionomics and occurrence of *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). Plant Quarantine, 13(1): 5–7 (in Chinese) [骆有庆, 李建光. 1999. 光肩星天牛的生物学特性及发生现状. 植物检疫, 13(1): 5–7]
- Mason CJ, Lowe-Power TM, Rubert-Nason KF, Lindroth RL, Raffa KF. 2016. Interactions between bacteria and aspen defense chemicals at the phyllosphere-herbivore interface. Journal of Chemical Ecology, 42(3): 193–201
- Meng PS, Hoover K, Keena MA. 2015. Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae), an introduced pest of maple and other hardwood trees in North America and Europe. Journal of Integrated Pest Management, 6(1): 4
- Mika A, Greenwood BN, Chichlowski M, Borchert D, Hulen KA, Berg BM, Paton M, Fleshner M. 2014. Dietary prebiotics increase *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in the gut and promote stress resistance. Brain, Behavior, and Immunity, 40(S): e45
- Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M. 1999. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Archives of Microbiology, 171(2): 81–91
- Schweigert N, Zehnder AJ, Eggen RI. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Environmental Microbiology, 3(2): 81–91
- Scully ED, Geib SM, Mason CJ, Carlson JE, Ming TE, Chen HY, Harding S, Tsai CJ, Hoover K. 2018. Host-plant induced changes in microbial community structure and midgut gene expression in an invasive polyphage (*Anoplophora glabripennis*). Scientific Reports, 8: 9620
- Serra A, Macià A, Romero MP, Reguant J, Ortega N, Motilva MJ. 2012. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. Food Chemistry, 130(2): 383–393
- Shao YY. 2019. Effects of nutrients and secondary metabolites of *Hippophae rhamnoides* on the transfer damage of *Eogystia hippophaecolus* larvae. Master thesis. Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese) [邵钰莹. 2019. 沙棘营养物质和次生代谢产物对沙棘木蠹蛾幼虫转移危害的影响. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学]
- Takács S, Hardin K, Gries G, Strong W, Bennett R. 2008. Vibratory communication signal produced by male western conifer seed bugs (Hemiptera: Coreidae). Canadian Entomologist, 140(2): 174–183
- Terada A, Hara H, Nakajyo S, Ichikawa H, Hara Y, Fukai K, Kobayashi Y, Mitsuoka T. 1993. Effect of supplements of tea polyphenols on the caecal flora and caecal metabolites of chicks. Microbial Ecology in Health and Disease, 6(1): 3–9
- Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. 2011. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(24): 12815–12820
- Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M. 2016. The generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. Frontiers in Microbiology, 7: 1005
- Wang CY, Li MS, Qu D, Li CL, Cui JT, Hu YH, Wang YJ. 2012. Identification and characterization of a newly isolated carbendazim-degrading bacterial strain MBC. Journal of Agro-Environment Science, 31(3): 563–569 (in Chinese) [王呈玉, 李明石, 曲迪, 李成龙, 崔俊涛, 胡耀辉, 王玉军. 2012. 一株新的多菌灵高效降解菌的筛选与降解特性分析. 农业环境科学学报, 31(3): 563–569]
- Wang L, Shi LL, Zhang YX, Liu YJ. 2007. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants. Journal of Wuhan Botanical Research, 25(5): 500–508 (in Chinese) [王莉, 史玲玲, 张艳霞, 刘玉军. 2007. 植物次生代谢物途径及其研究进展. 武汉植物学研究, 25(5): 500–508]

- Wang ZG, Huang DZ, Yan JJ. 2009. The sequence choice of the main tree species to *Anoplophora glabripennis* in northern part of China. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 32(6): 62–68 (in Chinese) [王志刚, 黄大庄, 阎浚杰. 2009. 中国北方主要树种对光肩星天牛抗性序列研究. *河北农业大学学报*, 32(6): 62–68]
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1): 3–19
- Xiang H, Huang YP. 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693 (in Chinese) [相辉, 黄勇平. 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. *昆虫知识*, 45(5): 687–693]
- Xiao JS, Shan JM, Cao YP, Wang CT, Xu N. 2012. Research progress in regulation of energy metabolism by polyphenols via intestinal flora. *Food Science*, 33(3): 300–303 (in Chinese) [肖俊松, 单静敏, 曹雁平, 王成涛, 许楠. 2012. 多酚通过肠道菌群调节能量代谢研究进展. *食品科学*, 33(3): 300–303]
- Yan WZ, Hao J, Sun JS, Shi JP. 2016. Isolation of *Raoultella* sp. sari01 and its heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characteristics. *Environmental Science*, 37(7): 2673–2680 (in Chinese) [颜薇芝, 郝健, 孙俊松, 史吉平. 2016. 拉乌尔菌 sari01 的分离及其异养硝化好氧反硝化特性. *环境科学*, 37(7): 2673–2680]
- Yan XF, Wan T, Liu YH. 2016. Four host trees affecting detoxification enzymes activities in adult *Anoplophora glabripennis*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32(14): 79–83 (in Chinese) [阎雄飞, 万涛, 刘永华. 2016. 4种寄主对光肩星天牛成虫解毒酶活性影响. *中国农学通报*, 32(14): 79–83]
- Yang X, Xu YH, Wei JH, Liu J, Zhang Y. 2013. Advances on the biosynthesis pathways and molecular regulation mechanism of several important defensive substances in plant secondary metabolism. *Letters in Biotechnology*, 24(2): 285–289 (in Chinese) [杨欣, 徐艳红, 魏建和, 刘娟, 张岩. 2013. 几种重要植物次生代谢防御反应物质的生物合成途径及分子调控机制研究进展. *生物技术通讯*, 24(2): 285–289]
- Yang Y, Yang RL, Zou YX, Liu XM. 2014. Recent advances in biotransformation of natural polyphenols by gut microflora. *Food Science*, 35(17): 319–325 (in Chinese) [杨艳, 杨荣玲, 邹宇晓, 刘学铭. 2014. 肠道微生物菌群生物转化天然多酚类化合物研究进展. *食品科学*, 35(17): 319–325]
- Yu F, Wang SY, Li J, Zhang Q, Li CD, Wang XL. 2009. C-ring cleavage of isoflavone daidzein by a newly-isolated facultative *Enterococcus hirae* AUH-HM195 from *Crossophilum mantchuricum* feces. *Acta Microbiologica Sinica*, 49(4): 479–484 (in Chinese) [于飞, 王世英, 李佳, 张琪, 李朝东, 王秀伶. 2009. 兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷原的开环转化. *微生物学报*, 49(4): 479–484]
- Zhu Y, Li J, Wang Z, Xiong SL, Pang HY, Fang ZY, Cai T. 2019. Advances in studies on physical and biochemical insect resistance in plants. *Agricultural Development & Equipments*, (3): 50–51 (in Chinese) [祝愿, 李俊, 王震, 熊胜利, 庞宏宇, 方志宇, 蔡滔. 2019. 植物的物理与生化抗虫性研究进展. *农业开发与装备*, (3): 50–51]

(责任编辑:李美娟)