取食不同饲料的柞蚕幼虫中肠形态、消化酶活性及菌群结构分析*

全 爽** 郭天凯 杜占军 高 伟 李喜升 韩 冰***

（辽宁省蚕业科学研究所，凤城 118100）

摘 要 **【目的】** 探究不同饲料育对柞蚕 3 龄幼虫中肠发育形态、消化酶活性及微生物群落的影响，为柞蚕 *Antheraea pernyi* 人工饲料配方优化与人工饲料适应性品种/品系培育奠定基础。**【方法】** 以柞蚕品种抗大为材料，进行 1 龄人工饲料育+2-3 龄新鲜柞叶育（ADKD，人工饲料组）和 1-3 龄新鲜柞叶育（CKKD，对照组）饲喂。解剖观察 3 龄幼虫中肠形态，提取中肠组织 DNA 与 16S rRNA 测序，进行脂肪酶、类胰蛋白酶、α-淀粉酶和海藻糖酶 4 种消化酶活性检测。**【结果】** 人工饲料组柞蚕 3 龄幼虫中肠形态较对照组无明显差异（肠壁厚度 $P = 0.082$，隐窝深度 $P = 0.290$）。人工饲料组消化酶中的类胰蛋白酶和海藻糖酶活性较对照组显著增加（$P < 0.05$），脂肪酶活性也有所增加。不同饲料育下 3 龄幼虫中肠菌群结构有差异，ADKD 的 Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数均高于 CKKD 组，说明人工饲料组中肠菌群多样性和构成较对照组更丰富。样品中细菌在门水平上主要归于变形杆菌门 Proteobacteria、蓝藻菌门 Cyanobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota 和放线菌门 Actinobacteriota。样品中变形菌门的相对丰度最高，其中 CKKD 组的相对丰度极显著高于 ADKD 组（$P < 0.01$），而 ADKD 组蓝藻菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门的相对丰度均高于 CKKD 组。物种丰度聚类结果明显分开。ADKD 组提高了毛螺菌_NK4A136 群（Lachnospiraceae_NK4A136 group）、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、丛毛单胞菌属 *Comamonas*、赖氨酸杆菌属 *Lysinibacillus*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、涅斯捷连科氏菌属 *Nesterenkonia*、独岛杆菌属 *Dokdonella*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、盐单胞菌属 *Halomonas*、肠球菌属 *Enterococcus*、库特氏菌属 *Kurthia*、马赛菌属 *Massilia* 和嗜冷杆菌属 *Psychrobacter* 等的相对丰度，而假单胞菌属 *Pseudomonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、泛菌属 *Pantoea* 和沙雷氏菌属 *Serratia* 等的相对丰度则降低。**【结论】** 人工饲料育柞蚕 3 龄幼虫的消化酶活性比鲜叶育增加，中肠菌群的多样性与丰富度更高，该结果可为人工饲料适应性柞蚕品种/品系筛选培育提供参考。

关键词 柞蚕；人工饲料；中肠；消化酶；肠道细菌

Effects of diet on the midgut morphology, digestive enzyme activity, and microbial community structure of *Antheraea pernyi* larvae

QUAN Shuang** GUO Tian-Kai DU Zhan-Jun GAO Wei LI Xi-Sheng HAN Bing***

(Sericulture Research Institute of Liaoning Province, Fengcheng 118100, China)

Abstract **[Aim]** To investigate the effects of different diets on the midgut morphology, digestive enzyme activity and microbial community of 3rd instar *Antheraea pernyi* larvae. **[Methods]** Larvae were randomly assigned to a treatment and control group. The treatment group (ADKD) was fed an artificial diet during the 1st instar stage and fresh leaves during the 2nd-3rd instar stages. The control group (CKKD) was fed fresh leaves during the 1st-3rd instar stages. The midguts of 3rd

*资助项目 Supported projects：辽宁省科技重大专项课题（2024JH1/11700009-4）；财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目（CARS-18）；辽宁省农业科学院基本科研业务费专项资金（2024QN1808）

**第一作者 First author，E-mail：Quanshuang24@126.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：18804150812@163.com

收稿日期 Received：2025-09-29；接受日期 Accepted：2026-02-11

instar larvae were dissected, the midgut tissue was fixed and sectioned, DNA extracted and 16S rRNA sequencing was performed. The activity of lipase, trypsin-like protease, α-amylase and trehalase, were measured. **[Results]** The midgut morphology of 3rd instar ADKD larvae was not significantly different to that of the CKKD group. The activity of trypsin-like protease and trehalase in the ADKD group was, however, significantly higher than in the CKKD group ($P < 0.05$), and lipase activity was also higher. The diversity and composition of the intestinal flora of 3rd instar larvae in the ADKD group differed from that in the CKKD group; the Ace index, Chao1 index and Shannon index of the ADKD Group were all higher than those of the CKKD group. At the phylum level, midgut bacteria mainly belonged to the Proteobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Bacteroidota and Actinobacteriota. The Proteobacteria had the highest relative abundance, significantly higher in the CKKD group than that in the ADKD group ($P < 0.01$). Conversely, the relative abundance of cyanobacteria, firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria in the ADKD group was higher than in the CKKD group. Relative species abundance was obviously different between the two groups. The Lachnospiraceae_NK4A136 group, *Lactobacillus*, *Comamonas*, *Lysinibacillus*, *Acinetobacter*, *Nesterenkonia*, *Dokdonella*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Halomonas*, *Enterococcus*, *Kurthia*, *Massilia* and *Psychrobacter*, were all more abundant in the ADKD group, whereas *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* and *Serratia* were less abundant in this group. **[Conclusion]** Compared to 3rd instar larvae reared on fresh leaves alone, those reared on an artificial diet had increased digestive enzyme activity and a more diverse and rich midgut microflora. These results provide a reference for screening and breeding varieties, and strains, of *A. pernyi* that are more suitable for rearing on an artificial diet.

Key words　*Antheraea pernyi*; artificial diets; midgut; digestive enzyme activity; intestinal bacteria

柞蚕 *Antheraea pernyi* 是我国传统的特色经济昆虫，我国年产柞蚕茧约 9 万吨，占世界总产量 90%以上；包括辽宁、吉林、黑龙江、河南、山东等在内的 11 个省(直辖市、自治区)共 13-14 万农户从事柞蚕生产，其经济、生态和社会效益显著，是柞蚕产区人民脱贫致富的重要经济来源之一（秦利等, 2016; 谌苗苗等, 2022）。柞蚕放养于野外，其幼虫期尤其是小蚕期受病虫鸟害、柞树生长状况及环境温度、湿度和风等因子影响较大（韩冰等, 2023）。近年来春蚕小蚕期极端天气频发，造成小蚕遗失严重，导致春蚕大幅度减产。人工饲料养蚕可以在小蚕期进行科学统一规范管理，获得春柞蚕的高产稳产。家蚕 *Bombyx mori* 已实现全龄人工饲料饲养，工厂化、规模化、智能化养殖正逐步替代传统的生产方式(龙从明等, 2025）。但柞蚕人工饲料配方研制与饲养实践则刚刚起步，关于柞蚕人工饲料育下幼虫发育、消化代谢等方面更知之甚少。

昆虫对不同饲料的适应性是一个复杂的生理过程，涉及中肠组织形态、生理生化及微生态的协同调控（Bonelli *et al*., 2019; Haider *et al*., 2025）。首先，中肠组织形态的完整性是消化吸收和物理防御的基础（Oliveira *et al*., 2019; Hixson *et al*., 2021），直接反映了食物对肠道的物理刺激或损伤程度；其次，消化酶活性体现了昆虫对特定营养成分的代谢能力，其活性高低是评价其对食物利用效率的关键生理指标（Jian *et al*., 2025）；同时，肠道菌群在动物生长发育中发挥重要作用，参与宿主的各种生理活动，包括营养和消化（Cummings *et al*., 1984）、免疫防御（Pickard *et al*., 2017; Sun *et al*., 2017）、生殖发育（Lin *et al*., 2019）和耐药性（Martinson *et al*., 2017; Scates *et al*., 2019）等。已有研究表明，食物组分的差异会显著影响昆虫中肠的适应性改变，进而影响肠道形态结构、消化酶谱改变及优势菌群演替，这三者之间存在一定的内在反馈机制（Priya *et al*., 2012; Krautkramer *et al*., 2016; Liu *et al*., 2018; Luo *et al*., 2021）。因此，系统解析中肠形态、消化酶与肠道菌群对饲料转换的响应变化，对于揭示柞蚕对人工饲料的适应机理至关重要。

基于柞蚕野性强、驯化困难等因素，同时结合柞蚕产业发展及柞蚕人工饲料开展的实际情况，本团队筛选了抗大等 3 个小蚕期人工饲料适应较好的柞蚕品种/品系（韩冰等, 2023），又开展了 1 龄人工饲料饲养、2 龄后转换为柞叶饲养试验。3 龄期为小蚕期与大蚕期过渡的关键时期，对于判断柞蚕取食程度、病害发生及生长

发育状况等十分重要，因此研究聚焦柞蚕 3 龄幼虫，探究不同饲料饲养对幼虫中肠发育形态、消化酶活性及肠道菌群结构的变化情况，旨在为人工饲料适应性柞蚕品种/品系筛选培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试蚕品种及饲育处理

供试柞蚕品种为抗大，由辽宁省蚕业科学研究所培育并保存。人工饲料（颗粒饲料）由辽宁省蚕业科学研究所研制，主要成分为柞树叶粉（麻栎）、大豆蛋白、豆粕粉、玉米粉、琼脂粉、柠檬酸、复合维生素、无机盐、防腐剂，不含抗生素。喂食前加 1.7 倍的无菌水浸泡，待水分全部均匀地被饲料吸入后将其平铺于玻璃皿中。试验分组：人工饲料组，1-3 龄新鲜柞叶育（CKKD）；对照组，1 龄人工饲料育+2-3 龄新鲜柞叶育（ADKD），每组设置 3 个重复，每个重复 300 头蚕。试验在辽宁省蚕业科学研究所四台子科研基地人工饲料养蚕室培养箱（SPX-500，江南仪器厂）中黑暗饲养，温度为（26±1）℃，相对湿度 75%±5%。新鲜柞叶为辽宁省蚕业科学研究所四台子科研基地 2 年生麻栎叶，新鲜采摘饲喂。

1.2 主要试剂与仪器

脂肪酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所（A054-2-1），α-淀粉酶检测试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司（微量法，100 管/48 样），胰蛋白酶和海藻糖酶检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司（BC2315、BC2515）。酶标仪（Multiskan FC，Thermo 公司），离心机（5430R，Eppendorf 公司）。

1.3 幼虫中肠发育形态观察

分别取两组饲养至 3 龄第 3 天的幼虫，饥饿 12 h 后解剖获取完整柞蚕中肠，用 1×PBS 溶液清洗，利用 4%多聚甲醛固定，4 ℃保存，每组取 10 头幼虫，送至北京康佳宏原生物科技有限公司进行组织包埋与切片制作。中肠经组织固定、脱水、浸蜡、切片、贴片、染色和封片处理，最后在切片扫描仪（PANNORAMIC，3DHISTECH 公司）下观察其形态结构，使用软件 CaseViewer 进行分析。

1.4 消化酶活性检测

取各组饲养至 3 龄第 3 天的幼虫，75%乙醇体表消毒后，1×PBS 溶液中清洗后用滤纸吸干水分，快速放入液氮中速冻，- 80 ℃冰箱保存。每组设 7 个生物学重复，每个重复 3 头幼虫。按试剂盒说明书检测。

1.5 16S rRNA PCR 扩增、高通量测序与数据分析

取各组饲养至 3 龄第 3 天的幼虫，1×PBS 溶液中清洗后用滤纸吸干水分，于无菌操作台内解剖获取中肠组织，快速放入液氮中速冻，- 80 ℃冰箱保存，送至上海元莘生物技术股份有限公司进行 16S rRNA 测序。完成基因组 DNA 抽提后，DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 检测，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 质量。使用通用引物 338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）对 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增。利用 Illumina Miseq 平台对各样本进行中肠细菌多样性测序。使用 Trimmomatic 软件对原始测序序列质控 FLASH 软件进行拼接。根据 Ilumina Miseq 平台构建 PE250 的文库。根据 97%的相似度对序列进行操作分类单位（Operational taxonomic unit, OTU）聚类，并去除单序列和合体，通过 I-Sanger 云平台数据库（https://cloudmajorbio.com/）对每条序列进行物种分类注释。

1.6 数据分析

数据处理采用 SPSS 25.0 软件，作图使用 Graphpad 8.0 软件，数据以平均值±标准误差表示。在分析前，使用 Shapiro-Wilk 和 Levene 检验分别对数据进行正态性分布和方差齐性验证。组间比较采用独立样本 *t* 检验。所有实验数据均重复 3 次以上。

2　结果与分析

2.1　不同饲料育对 3 龄柞蚕中肠组织形态结构的影响

不同饲料育下柞蚕 3 龄幼虫中肠发育状态如图 1（A）和图 1（B）所示。人工饲料组较对照组的中肠肠壁厚度（图 1：C）和隐窝深度（图 1：D）未见显著差异（$P = 0.08$, $P = 0.29$, t 检验），说明小蚕期人工饲料育下 3 龄幼虫中肠形态发育正常，饲料转换未对其造成负面影响。

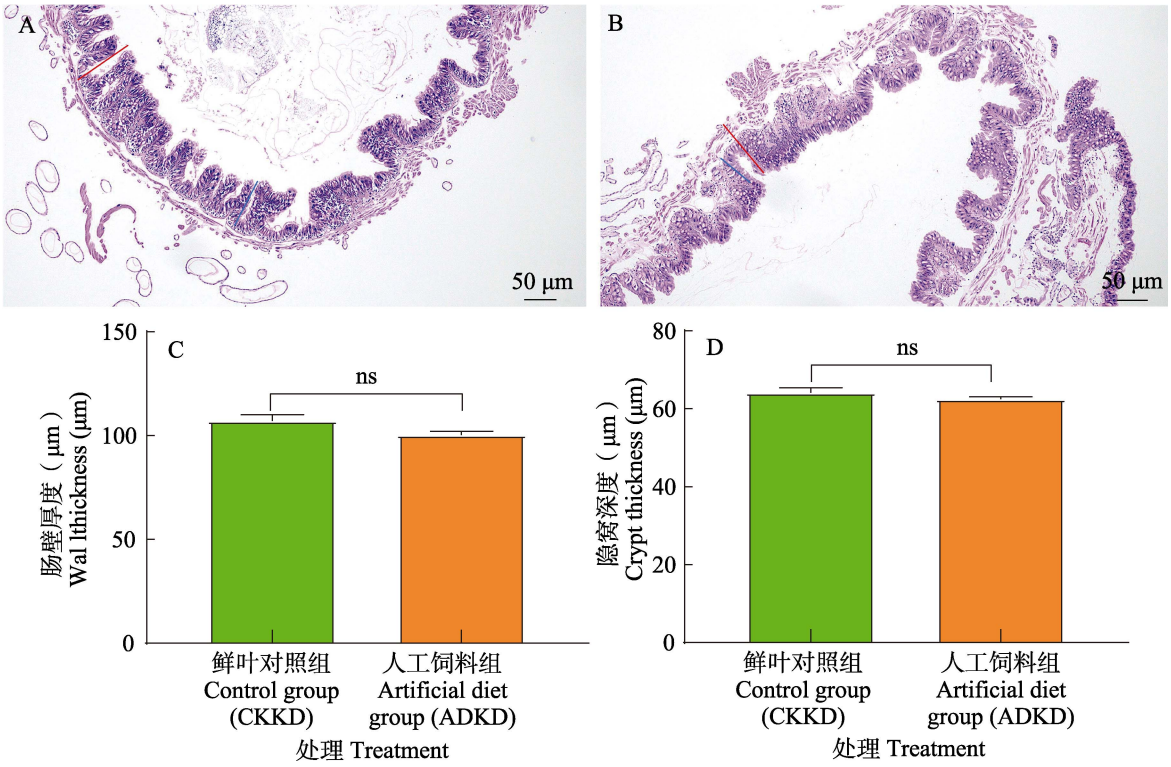

图 1　柞蚕幼虫中肠组织形态

Fig. 1　Tissue morphology of midgut of *Antheraea pernyi* larvae

A. 对照组（CKKD）中肠切片；B. 人工饲料组（ADKD）中肠切片；C. 对照组（CKKD）和人工饲料组（ADKD）中肠肠壁厚度；D. 对照组（CKKD）和人工饲料组（ADKD）中肠隐窝深度。CKKD: 对照组，1-3 龄新鲜柞叶育；ADKD: 人工饲料组，1 龄人工饲料育+2-3 龄新鲜柞叶育。ns 表示处理间差异不显著（$P > 0.05$，t 检验）。

A. Midgut histological picture of control group (CKKD); B. Midgut histological picture of artificial diet group (ADKD). C. Midgut wall thickness in control group (CKKD) and artificial diet group (ADKD); D. Midgut crypt thickness in control group (CKKD) and artificial diet group (ADKD). CKKD: Control group, reared on fresh oak leaves from the 1st to 3rd instar; ADKD: Artificial diet group, reared on artificial diet during the 1st instar, followed by fresh oak leaves from the 2nd to 3rd instar. ns indicates that the difference between treatments is not significant ($P > 0.05$, t-test).

2.2　不同饲料育对 3 龄柞蚕消化酶活性的影响

柞蚕 3 龄幼虫消化酶活性（表 1）分析表明，人工饲料组的脂肪酶、类胰蛋白酶和海藻糖酶活性较对照组均增加，其中类胰蛋白酶和海藻糖酶活性呈显著性增加（$P < 0.05$）。

2.3　不同饲料育对 3 龄幼虫中肠肠道菌群组成的影响

2.3.1　Alpha 多样性分析　人工饲料组和对照组 9 个中肠样品共获得 783 249 条高质量序列，平均长度为 425.61 bp。由图 2 可见，两组样品

共获得 654 个 OTU，其中对照组 285 个，人工饲料组 592 个，两组共有的 OTU 数为 223 个。与对照相比，人工饲料组 OTU 增加 1.08 倍，表明人工饲料育改变了中肠微生物细菌群落的多样性。

各处理组 Coverage 指数均在 99%以上，表明测序结果可代表样本中细菌的真实情况。人工饲料组的 Ace 指数、Chao1 指数均显著高于对照组（$P < 0.05$），Shannon 指数也高于对照组，表明人工饲料组中肠细菌的 α 多样性和丰富度均高于鲜叶对照组（表 2）。

表 1 消化酶活性

Table 1 Activity of digestive enzymes

处理组 Treatment group	消化酶 Digestive enzymes			
	脂肪酶（U/g） Lipase (U/g)	类胰蛋白酶（U/g） Trypsin (U/g)	α-淀粉酶（U/min/mg） α-Amylase (U/min/mg)	海藻糖酶（U/mg） Trehalase (U/mg)
对照组 Control group	10.89±1.590	0.03±0.005	3.00±0.270	0.04±0.020
人工饲料组 Artificial diet group	11.32±1.360	0.24±0.080 *	2.23±0.120	0.55±0.170 *

对照组（CKKD）：1-3 龄新鲜柞叶育；人工饲料组（ADKD）：1 龄人工饲料育+2-3 龄新鲜柞叶育。表中数据为平均值±标准误，星号表示显著差异（* P<0.05，** P<0.01，独立样本 t 检验）。下表同。

Control group (CKKD): Reared on fresh oak leaves from the 1st to 3rd instar; Artificial diet group (ADKD): Reared on artificial diet during the 1st instar, followed by fresh oak leaves from the 2nd to 3rd instar.Values in the table are mean±SE. Asterisks indicate significant difference (* P<0.05, ** P<0.01, independent samples t-test). The same below.

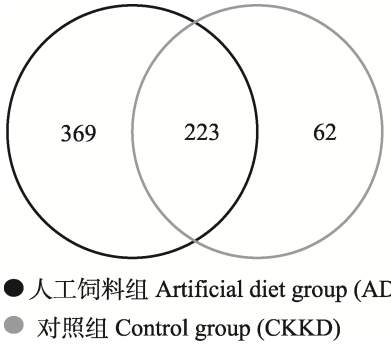

图 2 OUT 序列分布韦恩图

Fig. 2 Venn diagram showing the number of OTUs distributed

CKKD: 对照组，1-3 龄新鲜柞叶育；ADKD: 人工饲料组，1 龄人工饲料育+2-3 龄新鲜柞叶育。下图同。

CKKD: Control group, reared on fresh oak leaves from the 1st to 3rd instar; ADKD: Artificial diet group, reared on artificial diet during the 1st instar, followed by fresh oak leaves from the 2nd to 3rd instar. The same below.

2.3.2 Beta 多样性分析 基于 Weighted unifrac 的主坐标分析（PCoA）显示，主成分 PC1 和 PC2 对样品差异的贡献值分别为 58.59%和 17.49%。两组间群落结构差异显著（R^2=0.4，P = 0.006）（图 3），说明人工饲料组中肠微生物群落优势种类与对照组间存在明显差异。

2.3.3 门水平下的菌群结构 人工饲料组和对照组中肠细菌相对丰度大于 1%的菌门共 5 个，主要归于变形杆菌门 Proteobacteria、蓝藻菌门 Cyanobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota 和放线菌门 Actinobacteriota（表 3）。两组样品中变形菌门的相对丰度最高，其中对照组的相对丰度极显著高于人工饲料组（$P < 0.01$），另外人工饲料组蓝藻菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门的相对丰度均高于对照组。

2.3.4 物种聚类分析 物种丰度聚类分析见图 4，对照组和人工饲料组的物种丰度聚类明显分开。人工饲料组提高了毛螺菌_NK4A136 群（Lachnospiraceae_NK4A136 group）、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、丛毛单胞菌属 *Comamonas*、赖氨酸杆菌属 *Lysinibacillus*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、涅斯捷连科氏菌属 *Nesterenkonia*、独岛杆菌属 *Dokdonella*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、盐单胞菌属 *Halomonas*、肠球菌属 *Enterococcus*、库特氏菌属 *Kurthia*、马赛菌属 *Massilia* 和嗜冷杆菌属 *Psychrobacter* 等的相对丰度，而假单胞菌属 *Pseudomonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、泛菌属 *Pantoea* 和沙雷氏菌属 *Serratia* 等的相对丰度则降低，从而改变了菌群的结构。

表 2　Alpha 多样性分析

Table 2　Analysis of alpha diversity index

处理组 Treatment group	Ace 指数 Ace index	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	Coverage 指数 Coverage index
对照组 Control group	142.80±22.37	135.40±20.33	2.18±0.28	0.999 7
人工饲料组 Artificial diet group	263.75±56.39 *	258.75±55.93 *	2.79±0.31	0.999 7

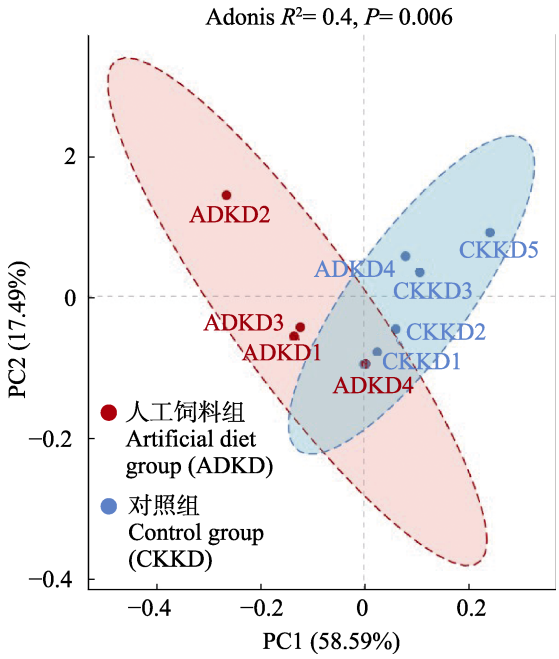

图 3　基于 Weighted unifrac 距离的主坐标分析（PCoA）

Fig. 3　PCoA based on Weighted unifrac distance

Adonis 分析，置换多元方差分析。
Adonis analysis, permutational multivariate analysis of variance.

表 3　门水平下的优势菌群分布（%）

Table 3　Distribution of dominant microflora at phylum level (%)

菌门名称 Phylum name	人工饲料组 Artificial diet group	对照组 Control group
变形菌门 Proteobacteria	60.93±4.83 **	87.42±3.36
蓝藻菌门 Cyanobacteria	16.74±7.55	2.71±1.27
厚壁菌门 Firmicutes	11.48±1.97	5.79±1.56
放线菌门 Actinobacteriota	5.60±0.68	1.98±0.80
拟杆菌门 Bacteroidota	5.50±2.25	1.22±0.45

3　讨论

柞蚕小蚕期人工饲料饲育探索对实现小蚕工厂化养蚕、有效节约柞园饲料资源、提高柞蚕茧产量、减轻柞蚕生产劳动强度、提高劳动生产效率，以及为传统柞蚕产业健康可持续发展提供技术支撑等具有重要意义（全爽等, 2023）。当前人工饲料育存在小蚕体质量低、攀爬能力弱及结茧率低、死笼率高等问题（韩冰等, 2023）。本研究观察到不同饲料育下柞蚕 3 龄幼虫中肠发育状态未见明显差异。消化酶活性方面，除 α-淀粉酶外，人工饲料组的脂肪酶、胰蛋白酶和海藻糖酶活性均高于对照组。此外，还对中肠肠道菌群进行了高通量测序，分析发现人工饲料组中肠菌群丰富度和多样性更高。综合分析，我们认为人工饲料育改变了中肠微生物的生存基质，进而改变了菌群的多样性与丰富度，而这种菌群结构的改变直接影响了幼虫的消化生理特征。

中肠组织对昆虫的生长、发育和繁殖至关重要。本研究发现人工饲料组和对照组中肠形态发育并无明显差异，说明人工饲料组柞蚕中肠肠道的发育正常，可为柞蚕后续更好地利用和消化营养物质打下基础。昆虫消化道中的酶系统在消化食物、吸收营养和能量转化过程中起着极为重要的作用，其与昆虫的生命活动和群体生活息息相关（Terra *et al*., 1994）。本研究发现人工饲料组的胰蛋白酶和海藻糖酶活性分别是对照组的 8.00 倍和 13.75 倍，脂肪酶活性也有增加。类胰蛋白酶是家蚕中肠中重要的消化酶（Premanand *et al*., 2010），本研究中人工饲料组中肠类胰蛋白酶活性显著增加，说明人工饲料育组的柞蚕 3 龄幼虫机体内蛋白消化增强。海藻糖酶和脂肪酶在机体能量储存与利用过程中发挥重要作用，海藻糖酶参与昆虫能量代谢，可水解海藻糖为葡萄

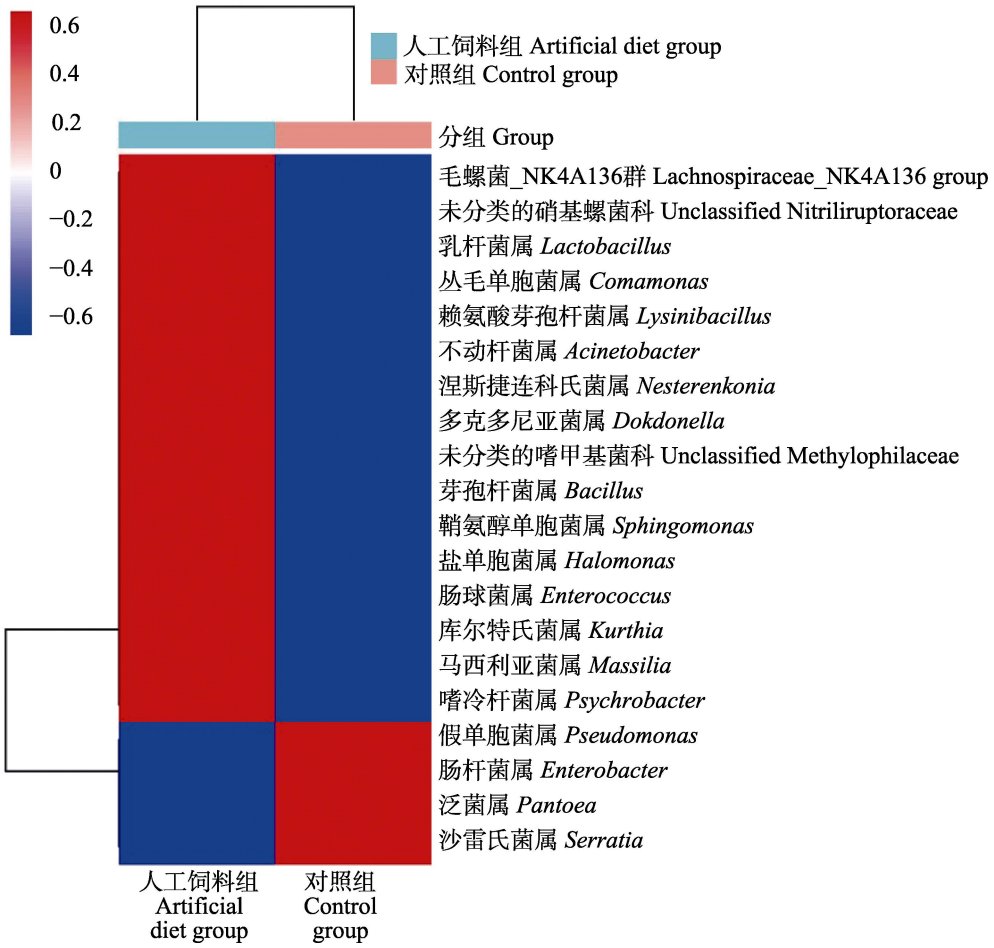

图 4　物种丰度聚类图（属水平）

Fig. 4　Heat map of species abundance (genus)

糖。脂肪酶可将家蚕的脂肪分解成甘油和脂肪酸，这些脂肪酸被吸收并最终合成为中肠上皮细胞中的甘油二酯和磷脂（Ponnuvel *et al*., 2003）。另外有研究表明，家蚕的肠道菌群也可以分泌脂肪酶（Feng *et al*., 2011），故推测脂肪酶活性增加可能也与肠道菌群结构的变化有关。给家蚕补充芽孢杆菌后显著增加了其中肠液中脂肪酶的活性（Ren *et al*., 2025），在黑广肩步甲 *Calosoma maximoviczi* 肠道中分离出沙雷氏菌属和芽孢杆菌属等产脂肪酶菌株，且酶活力较高，提示这些菌株可能与宿主的脂肪代谢相关（文竹等，2015）。昆虫家蚕小蚕期采用人工饲料饲育，后续生长期改用桑叶饲喂后，家蚕具有较强的补偿生长效应，可以较好地克服人工饲料养蚕效果差、蚕体弱等缺点，进而充分发挥人工饲料养蚕优势（Chinnaswamy *et al*., 2012）。故本研究中人工饲料组类胰蛋白酶、海藻糖酶等活性的增加可能是一种柞蚕体内蛋白与能量补偿的方式。因此，推测认为消化酶活性的增加与转换柞叶饲喂后柞蚕幼虫的补偿生长机制有关，还需要进一步研究验证。

本研究对人工饲料组和鲜叶对照组中肠微生物的多样性和组成结构进行分析，发现人工饲料组柞蚕中肠微生物多样性和群落结构发生明显变化。人工饲料组的 Shannon 指数显著高于对照组，指示丰富度的 Ace 指数和 Chao1 指数显著高于对照组，表明人工饲料组 3 龄柞蚕幼虫中肠微生物的多样性和丰富度更高。本研究中 3 龄柞蚕幼虫中肠的优势菌门包括变形杆菌门 Proteobacteria、蓝藻菌门 Cyanobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota 和放线菌门 Actinobacteriota，这也与张静雨等（2018）和

Wang 等（2020）在野外自然放养条件下发现的5 龄中期柞蚕幼虫中肠的优势菌门结果相吻合。对属水平上的肠道菌群进行分析发现包括芽孢杆菌和肠杆菌在内的多种菌属（邹昌瑞等, 2011），人工饲料组中肠乳酸杆菌 *Lactobacillus*、毛螺菌_NK4A136（Lachnospiraceae_NK4A136 group）以及肠球菌属 *Enterococcus* 等的丰度增加。乳酸杆菌属在维持肠道完整性、免疫调节和抑制有害病原体方面起着至关重要的作用（Carr *et al*., 2002; Lan *et al*., 2012; Gayle *et al*., 2016），还能合成各种维生素和氨基酸，调节蜜蜂的嗅觉学习和记忆（Ma *et al*., 2020;Li *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2022）。毛螺菌_ NK4A136 在碳水化合物合成和氨基酸代谢中起重要作用，参与小鼠生长发育调节（Huang *et al*., 2018; Hu *et al*., 2019）。这一菌属丰度的增加与人工饲料组中肠胰蛋白酶等消化酶活性增强相对应，有利于蛋白能量等的摄入以及维持代谢。人工饲料组海藻糖酶活性显著升高，可能与毛螺菌_NK4A136 群和乳酸杆菌属丰度增加有关。毛螺菌和乳酸杆菌是典型的短链脂肪酸（Short- chain fatty acids, SCFAs）产生菌。SCFAs 不仅是肠道上皮细胞的能量来源，还已被证实能上调宿主糖代谢相关酶的表达（Xu *et al*., 2022; Wijdeveld *et al*., 2023）。人工饲料组类胰蛋白酶活性显著增强，同时芽孢杆菌属丰度增加，推测与芽孢杆菌属细菌具有强大的胞外蛋白酶分泌能力有关，这种外源性酶可能进一步补充了宿主幼虫的内源性类胰蛋白酶(Cheng *et al*., 2019; Shad *et al*., 2024）。肠球菌属是一种能够降解大分子的菌属（Ceja-navarro *et al*., 2019; Liu *et al*., 2019），可为机体生长提供营养（Douglas *et al*., 2017）。

本研究未设置 1-3 龄人工饲料组，导致无法完全剥离饲料转换应激对相关指标的影响，但基于柞蚕现有的驯化程度及产业应用现状，该饲料育模式下的生理研究更具实践参考价值。综上所述，本研究发现人工饲料育柞蚕 3 龄幼虫中肠发育正常、消化酶活性增加且中肠菌群的多样性与丰富度更高。未来将逐步围绕 1-2 龄柞蚕人工饲料育及 1-3 龄柞蚕人工饲料育开展相关研究工作，为改进柞蚕人工饲料配方、实现柞蚕小蚕期人工饲料工厂化生产提供理论参考。

参考文献 (References)

Bonelli M, Bruno D, Caccia S, Sgambetterra G, Cappellozza S, Jucker C, Tettamanti G, Casartelli M, 2019. Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut. *Frontiers in Physiology*, 10: 204.

Carr F J, Chill D, Maida N, 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281–370.

Ceja-Navarro JA, Karaoz U, Bill M, Hao Z, White RA, Arellano A, Ramanculova L, Filley TR, Berry TD, Conrad ME, Blackwell M, Nicora CD, Kim YM, Reardon PN, Lipton MS, Adkins JN, Pett-Ridge J, Brodie EL, 2019. Gut anatomical properties and microbial functional assembly promote lignocellulose deconstruction and colony subsistence of a wood-feeding beetle. *Nature Microbiome*, 4(5): 864–875.

Chen MM, Wang Y, Li SY, Qin L, Li XS, 2022. Development and countermeasures of tussah industry from the perspective of scientific and technological innovation. *Science of Sericulture*, 48(2): 162–169. [谌苗苗, 王勇, 李树英, 秦利, 李喜升, 2022. 科技创新视角下的柞蚕产业发展与对策. 蚕业科学, 48(2): 162–169.]

Cheng FF, Chen H, Lei N, Zhang M, Wan HC, Shu GW, 2019. Effect of prebiotics, inorganic salts and amino acids for cell envelope proteinase production from *Lactobacillus plantarum* LP69. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 18(3): 269–278.

Chinnaswamy R, Lakshmi H, Kumari SS, Anuradha CM, Kumar CS, 2012. Nutrigenetic screening strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, for nutritional efciency. *Journal of Insect Science*, 12(1): 15.

Cummings JH, 1984. Microbial digestion of complex carbohydrates in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(1): 35–44.

Douglas AE, 2017. The B vitamin nutrition of insects: The contributions of diet, microbiome and horizontally acquired genes. *Current Opinion in Insect Science*, 23: 65–69.

Feng W, Wang XQ, Zhou W, Liu GY, Wan YJ, 2011. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *Journal of Insect Science*, 11(1): 1–10.

Gayle O, Yuan L, Louise H, Angela ED, Shireen AD, Julian AT, 2016. Molecular mechanism and functional significance of acid

generation in the *Drosophila* midgut. *Science Report*, 6: 27242.

Haider K, Abbas D, Galian J, Ghafar MA, Kabir K, Ijaz M, Hussain M, Khan KA, Ghramh HA, Raza A, 2025. The multifaceted roles of gut microbiota in insect physiology, metabolism, and environmental adaptation: Implications for pest management strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(3): 75.

Han B, Guo TK, Quan S, Li XS, Du ZJ, 2023. Adaptability of artificial diet to 4 *Antheraea Pernyi* varieties and difference analysis of SOD and CAT enzyme activities. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 54(3) : 275–281. [韩冰, 郭天凯, 全爽, 李喜升, 杜占军, 2023. 4 个柞蚕品种对人工饲料的适应性及其 SOD、CAT 酶活性差异分析. 沈阳农业大学学报, 54(3): 275–281.]

Hixson B, Taracena ML, Buchon N, 2021. Midgut epithelial dynamics are central to mosquitoes' physiology and fitness, and to the transmission of vector-borne disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 653156.

Hu S, Wang J, Xu Y, Yang H, Wang J, Xue C, Yan X, Su L, 2019. Antiinflammation effects of fucosylated chondroitin sulphate from *Acaudina molpadioides* by altering gut microbiota in obese mice. *Food Function*, 10(3): 1736–1746.

Huang G, Zhang S, Zhou C, Tang X, LI C, Wang C, Tang X, Suo J, Jia Y, El-Shram S, Yu Z, Cai J, Gupta N, Suo X, Liu X, 2018. Influence of *Eimeria falciformis* infection on gut microbiota and metabolic pathways in mice. *Infection and Immunity*, 86(5): e00073–18.

Jian LY, Yang YP, Xie SH, Lou YB, Chen L, Dai FL, Agrafioti Paraskevi, Cao Y, Christos GA, Li C, 2025. Life table parameters and digestive enzyme activity of *Araecerus fasciculatus* (Coleoptera: Anthribidae) feeding on different stored products. *Insects*, 16(4): 428.

Krautkramer KA, Kreznar JH, Romano KA, Vivas EI, Barrett-wilt GA, Rabaglia ME, Keller MP, Attie AD, Rey FE, Denu JM, 2016. Diet-microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Molecular Cell*, 64(5): 982–992.

Lan W, Chen Y, Wu H, Yanagida F, 2012. Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. *Folia Microbiologica*, 57(2): 99–105.

Li L, Solvi C, Zhang F, Qi Z, Chittka L, Zhao W, 2021. Gut microbiome drives individual memory variation in bumblebees. *Nature Community*, 12(1): 6588.

Lin L, Xie F, Sun D, Liu J, Zhu W, Mao S, 2019. Ruminal microbiome-host crosstalk stimulates the development of the ruminal epithelium in a lamb model. *Microbiome*, 7(1): 83.

Liu N, Li H, Chevrette M G, Zhang L, Cao L, Zhou H, Zhou X, Zhou Z, Pope PB, Currie CR, Huang Y, Wang Q, 2019. Functional metagenomics reveals abundant polysaccharide-degrading gene clusters and cellobiose utilization pathways within gut microbiota of a wood-feeding higher termite. *The ISME Journal*, 13(1): 104–117.

Liu SH, Chen Y, Li W, Li W, Tang GH, Yang Y, Jiang HB, Dou W, Wang JJ, 2018. Diversity of bacterial communities in the intestinal tracts of two geographically distant populations of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 111(6): 2861–2868.

Long CM, Xiong R, Guo MJ, Li W, Pan N, Yu HX, 2025. Overview of research and application of artificial diet rearing for the silkworm *Bombyx mori* in China. *China Sericulture*, 46(1): 49–54. [龙从明, 熊容, 郭铭建, 李伟, 潘旎, 余华献, 2025. 我国家蚕人工饲料育的研究与应用概况. 中国蚕业, 46(1): 49–54.]

Luo J, Cheng Y, Guo L, Wang AL, Lu M, Xu LT, 2021. Affiliations Expand. Variation of gut microbiota caused by an imbalance diet is detrimental to bugs' survival. *Science of the Total Environment*, 771: 144880.

Ma W, Zheng X, Li L, Shen J, Li W, Gao Y, 2020. Changes in the gut microbiota of honey bees associated with jujube flower disease. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198: 110616.

Martinson VG, Douglas AE, Jaenike J, 2017. Community structure of the gut microbiota in sympatric species of wild *Drosophila*. *Ecology Letters*, 20(5): 629–639.

Oliveira AH, Gonçalves WG, Fernandes KM, Barcellos MS, Sampaio, WMS, Lopes MP, Martins GF, Serrão JE, 2019. Morphology and morphometry of the midgut in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). *Insects*, 10(3): 73.

Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G, 2017. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279: 70–89.

Ponnuvel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M, 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 77(19): 10725–10729.

Premanand AA, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu IG, Vasan PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vendan SE, 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10(1): 107.

Priya NG, Ojha A, Kajla MK, Raj A, Rajagopal R, 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 7(1): e30768.

Qin L, Li SY, 2016. China Silkworm Science. Beijing: China Agricultural Press.1–8. [秦利, 李树英, 2016. 中国柞蚕学. 北京: 中国农业出版社. 1–8.]

Quan S, Guo TK, Du ZJ, Li XS, Han B, 2023. Diversity analysis of midgut intestinal bacterial composition in *Antheraea pernyi* larvae reared with different diets. *Sericulture Sciences*, 49(6): 490–497. [全爽, 郭天凯, 杜占军, 李喜升, 韩冰, 2023. 不同饲料育条件下柞蚕幼虫中肠细菌的多样性分析. 蚕业科学, 49(6): 490–497.]

Ren CJ, Meng YC, Liu YY, Wang Y, Wang HZ, Liu YT, Liu CJ, Fan X, Zhang SX, 2025. Probiotic *Bacillus subtilis* enhances silkworm (*Bombyx mori*) growth performance and silk production via modulating gut microbiota and amino acid metabolism. *Animal Microbiome*, 7(1): 103.

Scates SS, O'neal ST, Anderson TD, 2019. Bacteria-mediated modification of insecticide toxicity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 161: 77–85.

Shad, AA, Ahmad T, Iqbal MF, Asad MJ, Nazir Sidrah, Mahmood RT, Wajeeha AW, 2024. Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67: e24210355.

Sun Z, Kumar D, Cao G, Zhu L, Liu B, Zhu M, Liang Z, Kuang S, Chen F, Feng Y, Hu X, Xue R, Gong C, 2017. Effects of transient high temperature treatment on the intestinal flora of the silkworm *Bombyx mori*. *Science Report*, 7(1): 3349.

Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry*, 109(1): 1–62.

Wang H, Zhang J, Wang XM, Hu HL, Xia RX, Li Q, Zhu XW, Wang TM, Liu YQ, Qin L, 2020. Comparison of bacterial communities between midgut and midgut contents in two silkworms, *Antheraea pernyi* and *Bombyx mori*. *Science Report*, 10(1): 12966.

Wen Z, Wang Y, Jiang YR, Nie L, Li HJ, Sun LZ, Yang RS, Qin L, 2015. Separation of intestinal bacteria in *Calosoma maximociczi* adult and screening and identification of lipase-producing microbial strains. *Sericulture Sciences*, 41(6): 1044–1049. [文竹, 王勇, 姜义仁, 聂磊, 李慧君, 孙良振, 杨瑞生, 秦利, 2015. 黑广肩步甲(*Calosoma maximociczi*) 成虫肠道细菌的分离及产脂肪酶菌株的筛选与鉴定. 蚕业科学, 41(6): 1044–1049.]

Wijdeveld M, Schrantee A, Hagemeijer A, Nederveen AJ, Scheithauer TP, Levels JH, Prodan A, de Vos WM, Nieuwdorp M, Ijzerman RG, 2023. Intestinal acetate and butyrate availability is associated with glucose metabolism in healthy individuals. *iScience*, 26(12): 108478.

Xu JZ, Tang MQ, Liu YN, Xu JH, Xu XX, 2022. Safety assessment of monosodium glutamate based on intestinal function and flora in mice. *Food Science and Human Wellness*, 11(1): 155–164.

Zhang JY, Wang H, Bian HX, Wang TM, Liu YQ, 2018. Bacterial community structure and diversity in the intestine of chinese oak silkworm, *Antheraea Pernyi*. *Science of Sericulture*, 44(5): 678–685. [张静雨, 王欢, 边海旭, 王天茂, 刘彦群, 2018. 柞蚕肠道细菌菌群结构与多样性. 蚕业科学, 44(5): 678–685.]

Zhang X, Zhang F, Lu X, 2022. Diversity and functional roles of the gut microbiota in Lepidopteran insects. *Microorganisms*, 10(6): 1234.

Zou CR, Wei GQ, Liu CL, Zhu BJ, Wang ZG, Yang WJ, 2011. Analysis of bacterial community and screening and identification of enzyme-producing bacteria in intestine of *Antheraea pernyi*. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (12): 2575– 2581. [邹昌瑞, 魏国清, 刘朝良, 朱保建, 王在贵, 杨文静, 2011 柞蚕肠道菌群分析及产酶菌的筛选与鉴定. 中国农业科学, 44(12): 2575–2581.]