



基于单分子实时测序 (SMRT Cell) 的南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌多样性分析*

王文倩^{1**} 常吕恕^{1**} 杜广祖¹ 肖关丽^{2***} 杨进波³ 杨航³
易小光³ 张庭发³ 陈斌^{1***}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 3. 云南格瑞生物科技有限公司, 弥渡 675600)

摘要 【目的】为了弄清南美番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 幼虫肠道细菌的组成结构及多样性, 为其综合防治研究提供理论依据。【方法】采用单分子实时测序技术 (SMRT Cell) 对南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌 16S rDNA 全长进行测序分析。【结果】从南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道样本中共测得 25 903 条 Effective-CCS, 聚类为 134 个 OTU, 共注释到 14 门 22 纲 53 目 75 科 103 属 118 种的细菌。其中, 变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门, 占 93.95%, 欧文氏菌属 (*Erwinia*) 为优势菌属, 占 91.82%, *Erwinia iniecta* 为优势种, 占 91.82%, 其余种类的相对丰度均低于 1%。南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌多样性指数 ACE、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数分别为 77.308±13.489、77.821±12.771、0.156±0.039 和 0.835±0.190。【结论】南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌的群落物种组成丰富, 其中 *Erwinia iniecta* 为优势种。该研究结果可为南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌功能的挖掘及该害虫综合防治研究提供理论依据。**关键词** 番茄潜叶蛾; 肠道细菌; 多样性; 16S rDNA; 单分子实时测序技术

Diversity of the gut bacteria biome of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae based on single-molecule real-time sequencing (SMRT Cell)

WANG Wen-Qian^{1**} CHANG Lü-Shu^{1**} DU Guang-Zu¹ XIAO Guan-Li^{2***} YANG Jin-Bo³
YANG Hang³ YI Xiao-Guang³ ZHANG Ting-Fa³ CHEN Bin^{1***}

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, China; 2. College of Agriculture & Biology Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Yunnan Green Biotechnology Science and Technology Co. LTD, Midu 675600, China)

Abstract [Objectives] To investigate the community structure and diversity of the gut bacteria of *Tuta absoluta* larvae. [Methods] Single-molecule real-time sequencing techniques were used to sequence all regions of the bacterial 16S rDNA gene in the gut of third instar *T. absoluta* larvae. [Results] A total of 25 903 Effective-CCS and 134 OTUs were obtained and annotated into 14 phyla, 22 classes, 53 orders, 75 families, 103 genera and 118 species. The main phyla, genera and species were Proteobacteria (93.95%), *Erwinia* (91.82%) and *Erwinia iniecta* (91.82%); other species comprised less than 1% of the total. Ace, Chao1, Simpson and Shannon indices were 77.308±13.489, 77.821±12.771, 0.156±0.039 and 0.835±0.190, respectively. [Conclusion] The gut bacterial community of third instar *T. absoluta* larvae has high species diversity and the

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (32060616, 31760519); 云南省教育厅科研基金项目 (2020Y146), 云南农业大学第十五届学生科技创新创业行动基金项目 (2022ZKX149)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: wqwangts@163.com; 1504616946@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: chbins@163.com; glxiao9@163.com

收稿日期 Received: 2021-06-24; 接受日期 Accepted: 2022-03-26

dominant species is *E. iniecta*. These results could provide a theoretical basis for investigating gut bacterial function and for the comprehensive control of *T. absoluta* larvae.

Key words *Tuta absoluta*; gut bacteria; diversity; 16S rDNA; single-molecule real-time sequencing

南美番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick), 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 麦蛾科 Gelechiidae, 又名番茄潜叶蛾、番茄麦蛾。原产于南美洲秘鲁, 目前已在南美洲、欧洲、非洲、中美洲和亚洲的 80 多个国家和地区发生 (Desneux *et al.*, 2010; Biondi *et al.*, 2017)。该虫寄主植物广泛, 有 9 科 (茄科、豆科、锦葵科、苋科、藜科、菊科、旋花科、十字花科和禾本科) 约 40 种/属 (Desneux *et al.*, 2010; 张桂芬等, 2020)。2017 年 8 月, 在我国新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州露地鲜食番茄上首次发现 (张桂芬等, 2019), 2018 年 3 月在云南临沧发现其危害 (张桂芬等, 2020)。南美番茄潜叶蛾是威胁全球番茄生产最严重害虫之一, 不仅直接取食为害温室和露天的番茄, 还可传播植物病菌引起间接侵害, 造成番茄产量和品质严重下降, 经济损失可达 50%-100% (马菲等, 2011; 张润志, 2019)。

昆虫肠道中栖息的微生物群体数量极其庞大, 包括一些病毒、古细菌、细菌、真菌以及原生动动物等 (梅承等, 2018), 其中细菌约占 90% 左右, 它们与宿主相互依赖、相互影响并共同进化 (周帆等, 2020)。昆虫的肠道可为微生物提供栖息场所和所需养料, 而肠道微生物可帮助昆虫宿主消化分解食物中大分子物质以及合成某些昆虫寄主所需的营养物质 (Salem *et al.*, 2014; 郑亚强等, 2017), 并参与宿主免疫防御、解毒和抗药性 (Kikuchi *et al.*, 2012; 张云骅等, 2019; Chen *et al.*, 2020), 影响宿主寿命及发育周期、宿主的交配与繁殖能力和参与宿主的寄主选择 (McClean *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011), 降低宿主的寄主植物对宿主的防御能力等 (Chen *et al.*, 2019), 从而有利于宿主的生存繁衍。肠道微生物与昆虫宿主之间的相互依赖的关系, 也为害虫防治提供了一个可供选择的突破口。因此, 昆虫肠道微生物已经受到众多研究者的广泛关注。

传统肠道微生物研究方法主要是在体外从

样本中分离获得单一菌株, 纯培养后进行鉴定分析, 然而纯培养技术能获得的细菌仅占自然界细菌的一小部分, 低估了正常菌群的种类和数量, 影响肠道细菌群落多样性的判断 (梅承等, 2018)。16S rRNA 基因是存在于所有原核生物细胞中, 其片段大小适中, 序列具有保守性和高变性的特点, 是细菌鉴定的一个重要指标, 已经成为细菌鉴定最普遍的方法 (郑艺等, 2014)。随着高通量测序及数据分析技术的发展, 16S rRNA 基因扩增子测序技术已经用于很多昆虫的肠道细菌多样性研究, 如鳞翅目小菜蛾 *Plutella xylostella*、马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella* 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (夏晓峰, 2014; 徐天梅等, 2020; Zheng *et al.*, 2020)、双翅目泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* (张某等, 2016)、鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和松墨天牛 *Monochamus alternatus* 等 (王争艳等, 2020; 陈宏健等, 2021)。近年来, 在第一代和第二代测序的基础上, 第三代测序技术 (单分子 DNA 测序技术) 被开发出来并广泛被使用 (Treffer and Deckert, 2010)。单分子实时测序技术具有超长读长、测序周期短、无需模板扩增和直接检测表观修饰位点等特点, 而且在细菌鉴定过程中可将大多数种类鉴定到种水平, 这些优势为研究者提供了新的选择 (柳延虎等, 2015)。

因此, 本研究利用单分子实时测序技术对南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌的群落结构进行分析, 为进一步揭示南美番茄潜叶蛾肠道细菌在宿主生理生化中的作用机制及其防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

南美番茄潜叶蛾幼虫采集于昆明市北郊云南农业大学 (102°74'89" E, 25°13'16" N, 海拔 1 937 m) 番茄种植温室内。在实验室于室温条

件下, 将“寿禾粉冠”番茄植株置于 1 m×1 m×1 m 的尼龙网养虫笼中, 在植株上继代饲养 3 代, 建立室内稳定种群。

1.2 肠道解剖

取健康的南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫 50 头, 重复 3 次, 共 150 头, 置于无菌培养皿中饥饿处理 8 h。在超净工作台中进行解剖, 解剖前先将超净工作台台面清洗干净, 所有解剖器具用 75% 酒精消毒, 再用紫外灯照射处理 30 min 以上。解剖前将南美番茄潜叶蛾幼虫于 - 20 °C 冷冻 2-3 min, 待其麻痹后, 用无菌水冲洗 2 次, 每次 1 min, 75% 酒精消毒 20 s, 最后用无菌水冲洗 2 次, 每次 1 min (Zheng *et al.*, 2020)。取出后放置于无菌洁净的培养皿中, 用无菌镊子从虫体尾部取出肠道, 将内容物溶于装有 1 mL 无菌 PBS 缓冲液的离心管中, 置于 - 80 °C 冰箱保存备用。

1.3 DNA 提取和建库测序

肠道微生物总 DNA 的提取, 参照 QIAamp DNA Stool Mini kit 试剂盒说明书进行。提取 DNA 样品进检测合格后, 进行建库测序, 根据 16S rDNA 全长引物合成带有 Barcode 的特异引物, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库 (SMRT Cell), 建好的文库先进行文库质检, 质检合格的文库用 PacBio Sequel 进行测序。测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.4 数据分析

原始下机 subreads, 使用 SMRT Link v8.0 软件, 按照 minPasses ≥ 5, min Predicted Accuracy ≥

0.9 进行识别校正得到列出 CCS 的中文 (Circular consensus sequencing, CCS) 序列 (SMRT Link, version8.0), 然后使用 lima (v1.7.0) 软件, 通过 barcode 序列识别不同样品的 CCS 序列, 使用 cutadapt v2.7 (错误率 20%) 识别正向引物与反向引物, 丢弃掉不包含引物的 CCS 序列, 最后对 CCS 长度进行过滤, 丢弃不满足长度阈值 (1 200-1 650 bp) 的序列, 使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列, 得到高质量的 CCS 序列。使用 Usearch 软件 Reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类, 获得 OTU。以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对 OTU 进行分类学注释, 利用 QIIME2 软件对多样性指数进行计算, 利用 R 语言 ggplot 软件包绘制肠道细菌群落结构图。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量评估

采用单分子实时测序 (SMRT Cell) 的方法对取食番茄的南美番茄潜叶蛾的 3 龄幼虫肠道微生物进行了测序分析, 共获得 29 321 条 Raw CCS 序列, 平均每样品获得 9 773 条 CCS 序列 (表 1)。对 Clean CCS 进行 Barcode 识别, 长度过滤, 去除嵌合体后, 3 个样品共获得 25 903 条 Effective-CCS。基于 Effective-CCS 序列进行了 OTU 的划分, 3 个样品共获得 134 个 OTU。

从稀释曲线来看 (图 1), 3 个南美番茄潜叶蛾肠道样品的细菌 OTU 数量随着测序条数的加大, 趋于平缓, 样品中的细菌种类并不会随测序数量的增加而显著增多, 说明测序质量较好, 测序数据量能反映样本中绝大多数的细菌多样性信息。

表 1 南美番茄潜叶蛾幼虫 3 个肠道样品测序数据统计
Table 1 Sequencing data of 3 gut samples of *Tuta absoluta* larvae

样品 Samples	原始序列数 Raw CCS	去除引物后序列数 Clean CCS	有效序列数 Effective CCS	平均序列长度 (bp) Average length (bp)	有效序列比例 (%) Effective sequence ratio (%)
TU1	13 013	11 571	11 487	1 465	88.27
TU2	8 185	7 195	7 100	1 466	86.74
TU3	8 123	7 390	7 316	1 464	90.07

表 1 中 TU1-TU3 代表样品的 3 个重复。
TU1-TU3 represents 3 replicates of the sample.

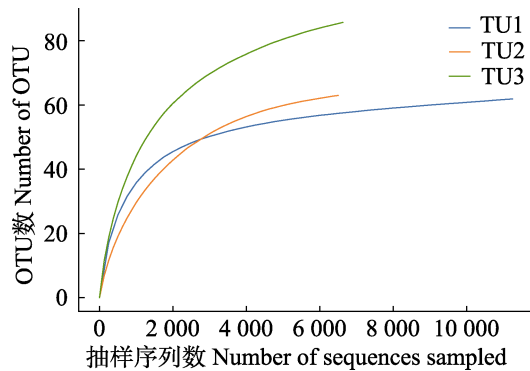


图 1 南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌组成稀释曲线
Fig. 1 Rarefaction curves of the observed species of gut bacteria of *Tuta absoluta* larvae

TU1-TU3 代表样品的 3 个重复。

TU1-TU3 represents 3 replicates of the sample.

2.2 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性 (Alpha diversity) 是对单个样品中物种多样性的分析, ACE、Chao1、Shannon 和 PD_whole_tree 指数越大, Simpson 指数越小, 说明样品中的物种越丰富多样。由表 2 可知, 南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌种类有较高的丰富度和多样性, 且样本文库的覆盖度极高。

2.3 南美番茄潜叶蛾肠道细菌组成及丰度

基于 SILVA 数据库, 将样品中物种丰度低于 0.1% 的物种全部合并为 Others。在门水平上, 南美番茄潜叶蛾 3 龄幼虫肠道细菌的 16S rDNA 序列文库共注释到了变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、梭杆菌门 Fusobacteriota、软壁菌门 Tenericutes、疣微菌门 Verrucomicrobia、蓝细菌门 Cyanobacteria 和弯曲杆菌门 Campilobacterota 等 14 个门, 其中, 变形菌门为优势门, 占 93.95%±1.81% (图 1: A)。

在纲水平上, 共注释了丙型变形菌纲

Gammaproteobacteria、芽孢杆菌纲 Bacilli、梭菌纲 Clostridia、放线菌纲 Actinobacteria、拟杆菌纲 Bacteroidia、梭杆菌纲 Fusobacteriia、 α -变形菌纲 Alphaproteobacteria、柔膜菌纲 Mollicutes、疣微菌纲 Verrucomicrobiae、红螯菌纲 Coriobacteriia、产氧光细菌纲 Oxyphotobacteria、嗜热油菌纲 Thermoleophilia、弯曲杆菌纲 Campylobacteria 等 24 个纲, 其中丙型变形菌纲为优势纲, 其相对丰度为 93.50%±1.98% (图 2: B)。

在目水平上, 共注释了肠杆菌目 Enterobacterales、乳酸杆菌目 Lactobacillales、梭菌目 Clostridiales、梭杆菌目 Fusobacteriales、伯克氏菌目 Burkholderiales、拟杆菌目 Bacteroidales、Propionibacteriales、微球菌目 Micrococcales、假单胞菌目 Pseudomonadales、Mollicutes RF39、振荡螺目 Oscillospirales、双歧杆菌目 Bifidobacteriales、Thiomicrospirales、甲基球菌目 Methylococcales、立克次氏体目 Rickettsiales、Staphylococcales、疣微菌目 Verrucomicrobiales、Chitinophagales、红螯菌目 Coriobacteriales、Flavobacteriales、根瘤菌目 Rhizobiales 和弯曲菌目 Campylobacteriales 等 53 个目, 其中肠杆菌目 Enterobacterales 为优势目, 其相对丰度为 92.14%±2.11% (图 2: C)。

在科水平上, 共注释了 75 个科的细菌, 其中欧文氏菌科 Erwiniaceae 为优势科, 其相对丰度为 91.82%±2.10%。乳杆菌科 Lactobacillaceae、疣微菌科 Ruminococcaceae、梭杆菌目 Fusobacteriaceae、链球菌科 Streptococcaceae、丙酸杆菌科 Propionibacteriaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、伯克氏菌科 Burkholderiaceae、uncultured bacterium o Mollicutes RF39、微球菌科 Micrococcaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、假单胞菌科 Pseudomonadaceae、双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae、Thioglobaceae、普雷沃氏菌科

表 2 南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌多样性指数

Table 2 Diversity index of gut samples of *Tuta absoluta* larvae

样品 Sample	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	辛普森指数 Simpson index	香农指数 Shannon index	PD_whole_tree 指数 PD_whole_tree index	覆盖度 (%) Coverage (%)
TU	77.308±13.489	77.821±12.771	0.156±0.039	0.835±0.190	8.165±0.740	99.800±0.100

TU 代表 TU1, TU2 和 TU3 的平均值。

TU represents the average of TU1, TU2, and TU3.

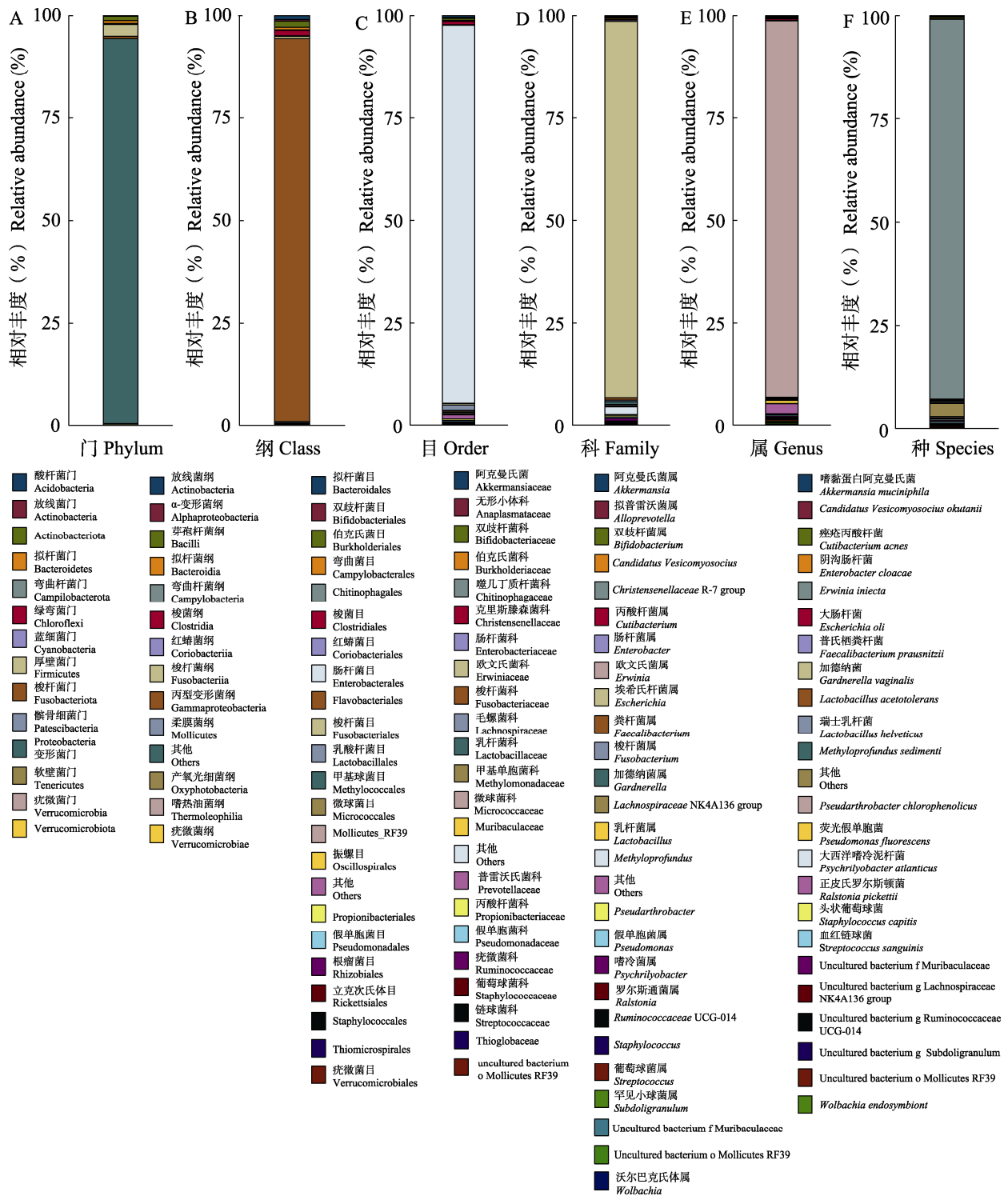


图 2 南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌组成的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of the dominant gut bacterial communities of *Tuta absoluta* larvae

A. 门水平的相对丰度; B. 纲水平的相对丰度; C. 目水平的相对丰度; D. 科水平的相对丰度; E. 属水平的相对丰度; F. 种水平的相对丰度。

A. Relative abundance of phylum; B. Relative abundance of class; C. Relative abundance of order; D. Relative abundance of family; E. Relative abundance of genus; F. Relative abundance of species.

Prevotellaceae、甲基单胞菌科 Methylomonadaceae、无形小体科 Anaplasmataceae、Muribaculaceae、阿克曼氏菌科 Akkermansiaceae、噬几丁质杆菌科 Chitinophagaceae、葡萄球菌科 Staphylococcaceae 和克里斯滕森菌科 Christensenellaceae 等科的相对丰度均小于 1% (图 2: D)。

在属水平上,共注释了 103 个属的细菌,其中 *Erwinia* 为优势属,其相对丰度为 $91.82\% \pm 2.10\%$ 。乳杆菌属 *Lactobacillus*、链球菌属 *Streptococcus*、丙酸杆菌属 *Cutibacterium*、*Psychrilyobacter*、uncultured bacteriumo Mollicutes RF39、罕见小球菌属 *Subdoligranulum*、*Pseudarthrobacter*、罗尔斯通菌属 *Ralstonia*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、“*Candidatus Vesicomysocius*”、粪杆菌属 *Faecalibacterium*、*Methyloprofundus*、沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*、uncultured bacterium f Muribaculaceae、Lachnospiraceae NK4A136 group、肠杆菌属 *Enterobacter*、拟普雷沃菌属 *Alloprevotella*、梭杆菌属 *Fusobacterium*、阿克曼氏菌属 *Akkermansia*、*Ruminococcaceae* UCG-014、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、埃希氏杆菌属 *Escherichia*、加德纳菌属 *Gardnerella*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 和 *Christensenellaceae* R-7 group 等属的相对丰度均小于 1%。

在种水平,共注释了 118 种细菌,其中 *Erwinia iniecta* 为优势种,其相对丰度为 91.82%。痤疮丙酸杆菌 *Cutibacterium acnes*、血红链球菌 *Streptococcus sanguinis*、大西洋嗜冷泥杆菌 *Psychrilyobacter atlanticus*、uncultured bacterium Mollicutes_RF39、uncultured bacterium g *Subdoligranulum*、*Pseudarthrobacter chlorophenolicus*、正皮氏罗尔斯顿菌 *Ralstonia pickettii*、瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、*Candidatus Vesicomysocius okutanii*、普氏栖粪杆菌 *Faecalibacterium prausnitzii*、*Methyloprofundus sedimenti*、耐酸乳杆菌 *Lactobacillus acetotolerans*、沃尔巴克氏体属内共生体 *Wolbachia endosymbiont*、uncultured bacterium f Muribaculaceae、uncultured bacterium g

Lachnospiraceae NK4A136 group、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila*、uncultured bacterium g *Ruminococcaceae* UCG-014、大肠杆菌 *Escherichia coli*、加德纳菌 *Gardnerella vaginalis* 和头状葡萄球菌 *Staphylococcus capitis* 等种类的相对丰度分别均小于 1%。

综上所述,变形菌门,丙型变形菌纲,肠杆菌目,欧文氏菌科,欧文氏菌属的 *E. iniecta* 为南美番茄潜叶蛾肠道优势菌。

3 讨论

利用单分子实时测序技术能有效分析南美番茄潜叶蛾肠道细菌组成结构,本研究发现该虫幼虫肠道细菌组成丰富,共注释到 14 门 22 纲 53 目 75 科 103 属 118 种的细菌,变形菌门为南美番茄潜叶蛾肠道细菌的优势菌门,占 93.95%。这与天敌昆虫泽兰实蝇、危险性害虫红火蚁 *Solenopsis invicta*、传粉昆虫油茶地蜂 *Andrena camellia* 和植物蛀干害虫松墨天牛肠道细菌的优势菌门相同(张某等, 2016; 陈宏健等, 2021; 寇若玫等, 2021; 押玉柯等, 2021)。但是,该结果与有些昆虫肠道中的优势菌门则有所不同,如除变形菌门的细菌外,与南美番茄潜叶蛾同科的茄科作物害虫马铃薯块茎蛾幼虫肠道内的优势菌门还有厚壁菌门(Zheng *et al.*, 2020); 储粮害虫赤拟谷盗肠道内的厚壁菌门和放线菌门也均为优势菌门(王争艳等, 2020)。由此可见,不同种类昆虫其肠道微生物多样性在门水平也存在较大差异。

本研究共注释到南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌 103 属,其中欧文氏菌属 *Erwinia* 为优势属,占 91.82%,这与已报道的同科的马铃薯块茎蛾肠道优势属存在很大差异,Zheng 等(2020)在取食 2 种马铃薯叶片的马铃薯块茎蛾幼虫中肠中发现 *Escherichia Shigella* 为优势属。由此可见,虽然南美番茄潜叶蛾与马铃薯块茎蛾都较喜食茄科的番茄、马铃薯、茄子、辣椒、烟草、龙葵等植物和杂草(王浩元等, 2013; 张桂芬等, 2018),但其肠道优势属存在很大差异,这可能

与其来源于不同寄主种群, 对不同寄主植物次生代谢物质的代谢机制不同有关 (Douglas, 2015)。研究表明欧文氏菌属的细菌为植物致病菌, 可导致蔷薇科植物发生火疫病并造成严重减产 (Dagher *et al.*, 2021; Sapir *et al.*, 2021)。该属中有些细菌也在昆虫体内存在, 如树皮甲虫 *Ips typographus* 和小菜蛾等 (Skrodenytė-Arbačiauskienė *et al.*, 2012; 李文红等, 2015)。然而, 欧文氏菌属 *Erwinia* 共生菌对南美番茄潜叶蛾的生理功能还未见报道, 仍需进一步研究。

近年来, 以昆虫共生菌为靶标的共生防治越来越受到科学家的重视 (Sinno *et al.*, 2020)。其可通过打破害虫与必须微生物之间的特殊的共生关系或通过操纵对害虫生理具有重要作用的共生微生物, 从而有效防控害虫, 其实施的关键是具有可培养的共生菌 (杨焯, 2012; Arora and Douglas, 2017)。本研究发现, 欧文氏菌属的 *E. iniecta* 为南美番茄潜叶蛾肠道优势种, 其相对丰度为 91.82%。该种细菌曾在俄罗斯小麦蚜虫 *Diuraphis noxia* 体内被分离到, 其可利用多种碳源, 如蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、D-木糖、D-甘露糖、熊果苷、纤维二糖、麦芽糖、棉子糖及乳糖等 (Campillo *et al.*, 2015)。推测该菌在南美番茄潜叶蛾生理生化方面发挥重要功能, 但其具体功能和共生方式还有待进一步的研究。此外, 还发现南美番茄潜叶蛾存在沃尔巴克氏菌的感染, 该菌是 α -变形菌门中分布最广泛的一组胞内细菌, 能感染许多节肢动物 (Turelli *et al.*, 2018)。研究表明沃尔巴克氏菌可调控宿主昆虫的生殖方式, 也可对宿主昆虫的睡眠、学习记忆、交配、摄食和攻击等行为产生一定影响 (Bi and Wang, 2020), 然而该菌对南美番茄潜叶蛾生理功能的研究鲜有报道。目前, 基于 *Wolbachia* 开发的昆虫不育技术和昆虫不相容技术, 已在一些卫生昆虫和农业害虫中得以应用, 如白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (Zheng *et al.*, 2019)、斑翅果蝇 *Drosophila suzukii* (Nikolouli *et al.*, 2018)、灰飞虱 *Nilaparvata lugens* (Gong *et al.*, 2020) 等。因此, 进一步的明确该类共生菌对南美番茄潜叶蛾生理功能及作用方式也将为该虫绿色防控技

术的开发提供理论依据。

本研究采用单分子实时测序技术对取食番茄的南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌群落多样性进行了分析, 明确了其肠道细菌组成, 为南美番茄潜叶蛾肠道细菌功能的挖掘提供了一定的研究基础。昆虫肠道微生物的多样性除了与昆虫种类有关外, 还与食物及环境因素相关 (相辉和黄勇平, 2008)。因此, 还需要进一步研究来自不同寄主、不同龄期和不同地理种群的番茄潜叶蛾幼虫的肠道微生物多样性, 以便更全面地明确南美番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌的多样性。

参考文献 (References)

- Arora AK, Douglas AE, 2017. Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control. *Journal of Insect Physiology*, 103: 10–17.
- Bi J, Wang YF, 2020. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts. *Insect Science*, 27(5): 846–858.
- Biondi A, Guedes R, Wan FH, Desneux N, 2017. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 63: 239–258.
- Campillo T, Luna E, Portier P, Saux MF, Lapitan N, Tisserat NA, Leach JE, 2015. *Erwinia iniecta* sp. nov., isolated from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10): 3625–3633.
- Chen BS, Zhang N, Xie S, Zhang XC, He JT, Muhammad A, Sun C, Lu XM, Shao YQ, 2020. Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides. *Environment International*, 143: 105886.
- Chen CY, Liu YQ, Song WM, Chen DY, Chen FY, Chen XY, Chen ZW, Ge SX, Wang CZ, Zhan S, Chen XY, Mao YB, 2019. An effector from cotton bollworm oral secretion impairs host plant defense signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(28): 14331–14338.
- Chen HJ, Zhou Y, Xia XH, Zhao XY, Qiao H, Tan JJ, Hao DJ, 2021. Diversity and functional analysis of intestinal bacteria in indoor and outdoor populations of adult *Monochamus alternatus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 61(3): 683–694. [陈宏健, 周杨, 夏小洪, 赵欣怡, 乔恒, 谈家金, 郝德君, 2021. 松墨天牛成虫室内外种群肠道细菌的多样性及功能分析. 微生物学报, 61(3): 683–694.]
- Dagher F, Nickzad A, Zheng J, Hoffmann M, Déziel E, 2021.

- Characterization of the biocontrol activity of three bacterial isolates against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology Open*, 10(3): e1202.
- Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys K, Burgio G, Arpaia S, Narva'ez-Vasquez CA, Cabrera JG, Ruescas DC, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T, Urbaneja A, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83(3): 197–215.
- Douglas AE, 2015. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60: 17–34.
- Gong JT, Li Y, Li TP, Hong XY, Baton L, 2020. Stable introduction of plant-virus-inhibiting *Wolbachia* into planthoppers for rice protection. *Current Biology*, 30(24): 4837–4845.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T, 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22): 8618–8622.
- Kou RM, Dou FY, Li HY, Zhou ZY, Long JG, Huang DY, 2021. Gut bacterial divergence between different larval instars of *Andrena camellia* Wu (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of Environmental Entomology*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20210406.1411.002.html>. [寇若玫, 窦飞越, 李红英, 周泽扬, 龙金桂, 黄敦元, 2021. 油茶地蜂不同龄期幼虫肠道细菌多样性及其差异分析. 环境昆虫学报 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20210406.1411.002.html>.]
- Li WH, Jin DC, Jin JX, Cheng Y, Li FL, 2015. Isolation, identification and antibiotic susceptibility testing of gut bacteria from larval feces of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 546–552. [李文红, 金道超, 金剑雪, 程英, 李凤良, 2015. 基于幼虫粪便的小菜蛾肠道细菌分离鉴定及其抗生素敏感性分析. 昆虫学报, 58(5): 546–552.]
- Liu YH, Wang L, Yu L, 2015. The principle and application of the single-molecule real-time sequencing technology. *Hereditas*, 37(3): 259–268. [柳延虎, 王璐, 于黎, 2015. 单分子实时测序技术的原理与应用. 遗传, 37(3): 259–268.]
- Ma F, Zhang JH, Yu YX, Cao YX, Duan SN, 2011. *Tuta absoluta* (Meyrick). *Plant Quarantine*, 25(5): 55–58. [马菲, 张俊华, 于艳雪, 曹逸霞, 段胜男, 2011. 番茄麦蛾. 植物检疫, 25(5): 55–58.]
- Mclean AHC, Asch MV, Ferrari J, Godfra HCJ, 2011. Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proceedings Biological Sciences*, 278(1706): 760–766.
- Mei C, Fan S, Yang H, 2018. Research progress in isolation and culture strategies of insect intestinal microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 58(6): 985–994. [梅承, 范硕, 杨红, 2018. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展. 微生物学报, 58(6): 985–994.]
- Nikolouli K, Colinet H, Renault D, Enriquez T, Mouton L, Gibert P, Sassu F, Cáceres C, Stauffer C, Pereira R, Bourtzis K, 2018. Sterile insect technique and *Wolbachia* symbiosis as potential tools for the control of the invasive species *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science*, 91(2): 489–503.
- Salem H, Bauer E, Strauss AS, Vogel H, Marz M, Kaltenpoth M, 2014. Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281: 1796–1838.
- Sapir YB, Shlomit D, Mayan E, Livnat A, 2021. Identification and characterization of a new quorum-quenching N-acyl homoserine lactonase in the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69: 5652–5662.
- Sinno M, Bézier A, Vinale F, Giron D, Laudonia S, Garonna AP, Pennacchio F, 2020. Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. *Pest Management Science*, 76(9): 3199–3207.
- Skrodenytė-Arbačiauskienė V, Radžiūtė S, Stunžėnas V, Būda V, 2012. *Erwinia typographi* sp. nov., isolated from bark beetle (*Ips typographus*) gut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4): 942–948.
- Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F, 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metabolism*, 14(3): 403–414.
- Treffler R, Deckert V, 2010. Recent advances in single-molecule sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1): 4–11.
- Turelli M, Cooper BS, Richardson KM, Ginsberg PS, Peckenpaugh B, Antelope CX, Kim KJ, May MR, Abrieux A, Wilson DA, Bronski MJ, Moore BR, Gao JJ, Eisen MB, Chiu JC, Conner WR, Hoffmann AA, 2018. Rapid global spread of wRi-like *Wolbachia* across multiple *Drosophila*. *Current Biology*, 28(6): 963–971.
- Wang HY, Zhang LM, Chen B, Li ZY, 2013. Feeding selectivity of *Phthorimaes operculella* (Zeller) on different host plants. *Chinese Potato Journal*, 27(4): 226–231. [王浩元, 张立敏, 陈斌, 李正跃, 2013. 马铃薯块茎蛾幼虫对不同寄主植物的取食选择性. 中国马铃薯, 27(4): 226–231.]
- Wang ZY, Wang Y, He MT, Lu YJ, 2020. Diversity of intestinal bacteria in different geographic populations of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 617–622. [王争艳, 王洋, 何梦婷, 鲁玉杰, 2020. 不同地理种群赤拟谷盗肠道细菌群落多样性分析. 应用昆虫学报, 57(3): 617–622.]

- Xia XF, 2014. Organizational diversity and functional characterization of microbiota in the midgut of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Doctoral dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [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.]
- Xu TM, Fu CY, Su ZT, Xiao GL, Li WW, Chen B, 2020. Composition and diversity of gut bacteria community of *Spodoptera frugiperda* from the first invasion site and the dispersal area in Yunnan province. *Plant Protection*, 46(4): 116–125. [徐天梅, 符成悦, 苏造堂, 肖关丽, 李维薇, 陈斌, 2020. 云南草地贪夜蛾扩散区与首发地种群肠道细菌群落组成结构及多样性的比较. 植物保护, 46(4): 116–125.]
- Ya YK, Xia M, Li J, Wu SY, 2021. Diversity analysis of intestinal flora in the third and fourth-instar larvae of *Solenopsis invicta*. *Journal of Environmental Entomology*, 43(2): 420–429. [押玉柯, 夏敏, 李军, 吴少英, 2021. 红火蚁三龄、四龄幼虫肠道细菌群落多样性分析. 环境昆虫学报, 43(2): 420–429.]
- Yang H, 2012. Diversity of gut bacteria in larval of four lepidopteran insect species. Master dissertation, Nanjing: Nanjing Agricultural University. [杨焜, 2012. 四种鳞翅目害虫肠道细菌多样性分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Zhang GF, Liu WX, Wan FH, Xian XQ, Zhang YB, Guo JY, 2018. Bioecology, damage and management of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), a worldwide quarantine pest. *Journal of Biosafety*, 27(3): 155–163. [张桂芬, 刘万学, 万方浩, 冼晓青, 张毅波, 郭建洋, 2018. 世界毁灭性检疫害虫番茄潜叶蛾的生物生态学及危害与控制. 生物安全学报, 27(3): 155–163.]
- Zhang GF, Ma DY, Liu WX, Wang YS, Fu WJ, Wang J, Gao YH, Wan FH, 2019. The arrival of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in China. *Journal of Biosafety*, 28(3): 200–203. [张桂芬, 马德英, 刘万学, 王玉生, 付文君, 王俊, 高有华, 万方浩, 2019. 中国新发现外来入侵害虫——南美番茄潜叶蛾(鳞翅目: 麦蛾科). 生物安全学报, 28(3): 200–203.]
- Zhang GF, Xian XQ, Zhang YB, Zhang R, Ma DY, Liu WX, Gao YH, Wang J, Yang ZL, Li QH, Wang YS, Xue YT, Wan FH, 2020. Warning of the dispersal of a newly invaded alien species, tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick), in China. *Plant Protection*, 46(2): 281–286. [张桂芬, 冼晓青, 张毅波, 张蓉, 马德英, 刘万学, 高有华, 王俊, 杨子林, 李庆红, 王玉生, 薛延韬, 万方浩, 2020. 警惕南美番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 在中国扩散. 植物保护, 46(2): 281–286.]
- Zhang M, Yang P, Zhu JY, Yuan Y, Gui FR, Gao X, Wu GX, 2016. Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence. *Acta Entomologica Sinica*, 59(2): 200–208. [张某, 杨璞, 朱家颖, 袁远, 桂富荣, 高熹, 吴国星, 2016. 基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析. 昆虫学报, 59(2): 200–208.]
- Zhang RZ, 2019. *Tuta absoluta* (Povolny) damage symptoms (Fruits). *Journal of Applied Entomology*, 56(5): 996. [张润志, 2019. 番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Povolny) 危害状(果实). 应用昆虫学报, 56(5): 996.]
- Zhang YY, Li JH, Wan H, 2019. Research progress on detoxification metabolic relationship between insect symbiotic bacteria and host. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 21(Z1): 729–735. [张云骅, 李建洪, 万虎, 2019. 昆虫共生菌与宿主的解毒代谢关系研究进展. 农药学报, 21(Z1): 729–735.]
- Zheng XY, Zhang DJ, Li YJ, Yang C, Wu Y, Liang X, Liang YK, Pan XL, Hu LC, Sun Q, Wang XH, Wei YY, Zhu J, Qian W, Yan ZQ, Parker AG, Gilles JR, Bourtzis K, Bouyer J, Tang MX, Zheng B, Yu JS, Liu JL, Zhuang JJ, Hu ZG, Zhang MC, Gong JT, Hong XY, Zhang ZB, Lin LF, Liu QY, Hu ZY, Wu ZD, Baton LA, Hoffmann A, Xi ZY, 2019. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*, 572(7767): 56–61.
- Zheng Y, Zhang JC, Guo Z, Zhang HP, 2014. Research progress in analysis of intestinal flora and its influencing factors based on high-throughput sequencing technology. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 14(11): 157–164. [郑艺, 张家超, 郭壮, 张和平, 2014. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展. 中国食品学报, 14(11): 157–164.]
- Zheng YQ, Du GZ, Li YF, Chen Bin, Li ZY, Xiao GL, 2017. Isolation and identification of bacteria from larval gut of the potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* (Zeller) and the degradation for plant-based macromolecular compounds. *Journal of Environmental Entomology*, 39(3): 525–532. [郑亚强, 杜广祖, 李亦菲, 陈斌, 李正跃, 肖关丽, 2017. 马铃薯块茎蛾肠道细菌分离鉴定及其对植物源大分子化合物的降解作用. 环境昆虫学报, 39(3): 525–532.]
- Zheng YQ, Xiao GL, Zhou WW, Gao YL, Li ZY, Du GZ, Chen B, 2020. Midgut microbiota diversity of potato tuber moth associated with potato tissue consumed. *BMC Microbiology*, 20(6): 149–166.
- Zhou F, Pang ZH, Yu XQ, Wang XY, 2020. Insect gut microbiota research: Progress and applications. *Journal of Applied Entomology*, 57(3): 600–607. [周帆, 庞志倡, 余小强, 汪肖云, 2020. 昆虫肠道微生物的研究进展和应用前景. 应用昆虫学报, 57(3): 600–607.]