



薛育, 丁嘉欣, 王海旭, 樊蓉蓉, 顾欣, 王新谱. 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫的肠道细菌群落组成及多样性特征 [J]. 环境昆虫学报, 2025, 47 (1): 76–86. XUE Yu, DING Jia-Xin, WANG Hai-Xu, FAN Rong-Rong, GU Xin, WANG Xin-Pu. Characteristics of the composition and diversity of gut bacterial communities in larvae of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) at various developmental stages [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2025, 47 (1): 76–86.

## 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫的肠道细菌群落组成及多样性特征

薛育, 丁嘉欣, 王海旭, 樊蓉蓉, 顾欣, 王新谱\*  
(宁夏大学农学院, 银川 750021)

**摘要:** 植食性昆虫肠道细菌的组成与其发育阶段密切相关, 并且能为宿主昆虫提供多方面的功能。然而番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 肠道细菌与发育龄期相关研究鲜有报道, 本研究旨在探究番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌多样性特征及预测其功能。本研究选取番茄潜叶蛾 1~4 龄幼虫, 提取幼虫肠道细菌基因组 DNA, 利用 Illumina MiSeq 二代高通量测序技术, 分析其肠道细菌多样性和丰度。Alpha 多样性分析显示, 番茄潜叶蛾 1 龄幼虫肠道细菌多样性和丰富度最高, 且肠道细菌丰富度随龄期增加而降低。番茄潜叶蛾 4 个龄期肠道细菌的优势门均为变形菌门 Proteobacteria, 除了 4 龄幼虫的优势菌属是肠杆菌属 *Enterobacter* 以外, 其他龄期幼虫的优势菌属是沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*。PICRUSt2 基因功能预测显示番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌参与碳水化合物、氨基酸、能量的代谢, 表明其可能在食物消化吸收和营养供给等方面发挥重要作用, 其中不同龄期肠道细菌新陈代谢 Metabolism 功能有显著差异, 1 龄幼虫功能基因比例明显高于 3 龄、4 龄。研究结果可为探索番茄潜叶蛾肠道细菌与宿主的相互作用奠定基础, 也为番茄潜叶蛾的适应性进化和综合治理提供更多的视角和方向。

**关键词:** 番茄潜叶蛾; 肠道细菌; 多样性; 龄期; 高通量测序

中图分类号: Q968.1; Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2025) 01-0076-11

### Characteristics of the composition and diversity of gut bacterial communities in larvae of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) at various developmental stages

XUE Yu, DING Jia-Xin, WANG Hai-Xu, FAN Rong-Rong, GU Xin, WANG Xin-Pu\* (School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** The gut bacteria composition in phytophagous insects is closely linked to their developmental stages and can fulfill multiple functions for the host insect. However, few studies have investigated the relationship between gut bacteria and developmental stages in the tomato leaf miner moth, *Tuta absoluta* (Meyrick). This study aimed to characterize the diversity of gut bacteria in larvae of different instar stages of *T. absoluta* and to predict the functional roles of these bacteria. We extracted genomic DNA from the gut bacteria of *T. absoluta* larvae at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 4<sup>th</sup> instar stages, and analyzed the diversity and abundance of the gut bacteria using Illumina MiSeq II high-throughput sequencing technology. Alpha diversity analysis indicated that gut bacterial diversity and abundance peaked in the 1<sup>st</sup> instar larvae of *T. absoluta* and diminished as instar age increased. The dominant phylum of gut bacteria across all four instar

基金项目: 宁夏重点研发计划重点项目 (2023BCF01045); 宁夏大学研究生创新项目 (CXXM202350)

作者简介: 薛育, 女, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: 15603771567@163.com

\*通讯作者 Author for correspondence: 王新谱, 男, 博士, 教授, 研究方向为昆虫生态学与害虫综合防治, E-mail: wangxinpu@nxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-08-23; 修回日期 Revision received: 2024-11-20; 接受日期 Accepted: 2024-11-20

stages was Proteobacteria. Excepting that *Enterobacteria* was the dominant genus in the 4<sup>th</sup> instar larvae, whereas *Wolbachia* was predominant in the other instars. Predicted functional analysis based on the PICRUS2 gene database revealed that the gut bacteria in *T. absoluta* larvae participated in carbohydrate, amino acid, and energy metabolism, suggesting their crucial roles in digestion, absorption, and nutrient provision. Among them, there were significant differences in the metabolism function of intestinal bacteria at different instars and the 1<sup>st</sup> instar larvae were significantly higher than that in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instars. This study provides a foundational basis for exploring the interactions between gut bacteria and their host in *T. absoluta* and offers additional insights and directions towards the adaptive evolution and integrated management of this pest.

**Key words:** *Tuta absoluta*; gut bacteria; diversity; instar; high-throughput sequencing

番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 麦蛾科 Gelechiidae, 起源于南美洲西部秘鲁中部高地 (Biondi *et al.*, 2018), 是危害全球番茄生产的重大国际检疫性害虫。2017年, 我国新疆伊犁首次发现番茄潜叶蛾 (张桂芬等, 2019), 随后在云南、贵州、宁夏等地相继发现 (陆永跃, 2021)。其主要以幼虫期为害寄主植物的叶片、顶梢、腋芽、嫩茎及果实, 寄主植物广泛, 包含茄子、马铃薯、西瓜、辣椒、枸杞在内的 11 科 50 多种植物。番茄潜叶蛾喜食番茄, 发生严重时会导致番茄减产 80%~100%, 已成为世界番茄生产的主要威胁。

昆虫肠道内栖息着种类繁多的微生物, 包括细菌、真菌、古细菌、原生动物和病毒, 其中细菌含量最丰富 (Gurung *et al.*, 2019), 它们与宿主相互依赖、相互影响、共同进化。肠道微生物具有丰富的种群结构, 同时具有多样的生物学功能, 可以帮助宿主消化食物中的大分子物质 (Pilon *et al.*, 2017)、为宿主生长发育提供营养物质 (Xia *et al.*, 2017)、提高宿主的生存或繁殖力 (Arai *et al.*, 2018)、影响宿主防御 (Shao *et al.*, 2017) 和解毒能力 (Vilanova *et al.*, 2016) 及对杀虫剂的抗性 (Hu *et al.*, 2022)。昆虫肠道作为微生物生存的一种独特环境, 其复杂多变, 使得微生物具有多样性。对以不同寄主植物饲喂的美国白蛾 *Hyphantria cunea* 研究发现食物会影响肠道细菌的多样性和菌群结构 (邓竣丹等, 2022)。梨小食心虫 *Grapholita molesta* 肠道微生物因取食不同寄主植物存在显著差异, 并在寄主适应中发挥重要作用 (Yuan *et al.*, 2021)。另外有研究发现不同发育龄期也会对昆虫肠道微生物多样性产生影响, 例如大分舌蜂 *Colleles gigas* 幼虫从低龄期生长至高龄期细菌多样性随之降低 (寇若玫等, 2021), 稻

飞虱 *Cnaphalocrocis medinalis* 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 不同发育阶段肠道微生物多样性和群落结构也会发生变化 (Yang *et al.*, 2020; Fu *et al.*, 2023)。

当前已经有较多研究关注番茄潜叶蛾肠道微生物, 如杨亚贤等 (2024) 研究了取食不同寄主植物的番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌的多样性, 发现寄主会使肠道细菌的群落组成和多样性产生差异; Wang 等 (2022) 对番茄潜叶蛾西班牙种群、云南种群和新疆种群肠道微生物群的组成和多样性进行研究发现不同地区番茄潜叶蛾的微生物结构相似; Bi 等 (2023) 研究发现交配会导致番茄潜叶蛾生殖器官和肠道中细菌群落的转移。此外, 前期也对番茄潜叶蛾肠道微生物的功能进行了研究, 如常吕恕等 (2022, 2023) 发现番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌对淀粉和纤维素大分子化合物具有较强的降解作用, 也会参与氨基酸和核苷酸等代谢途径; Eski 等 (2023) 发现从有化学杀虫剂抗性的番茄潜叶蛾幼虫中分离出的苏云金芽孢杆菌 (Bt-Ta1) 有潜力用于对番茄潜叶蛾的综合治理。

截止目前, 关于番茄潜叶蛾不同发育龄期肠道微生物如何变化鲜有报道, 本研究采用 Illumina MiSeq 二代高通量测序方法, 分析不同龄期番茄潜叶蛾肠道菌群结构和多样性的差异, 并对肠道细菌的功能进行预测, 以期后续深入研究番茄潜叶蛾肠道细菌和宿主互作提供基础和思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 番茄潜叶蛾幼虫饲养

试验所用的番茄潜叶蛾幼虫为宁夏大学农学院植保实验室人工实验种群 (初始虫源采自宁夏

回族自治区银川市西夏区军马场番茄大棚，继代饲养3代，建立室内稳定种群)。饲喂寄主为番茄叶片(品种为普罗旺斯，取自生长期的嫩叶)，种群饲养的环境温度为 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期16 L: 8 D，相对湿度为 $60\%\pm 5\%$ 。

### 1.2 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌基因组 DNA 的提取

随机选择人工饲养的第3代体型大小一致、生长健康的1龄、2龄、3龄、4龄幼虫各50头，每组设置3个重复。番茄潜叶蛾幼虫饥饿2 h后，75%酒精表面消毒90 s，2次无菌水漂洗后在体视显微镜下解剖幼虫肠道，并将肠道置于200  $\mu\text{L}$  无菌水中，整个过程均在无菌条件下进行。震荡仪破碎幼虫肠道组织并混匀，肠道细菌基因组DNA提取采Soil And Stool DNA Kit (CWBIO, CW2091S)试剂盒，具体步骤参照试剂盒说明书。使用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA的质量，使用NanoDrop 2000(美国Thermo Scientific公司)测定DNA浓度和纯度。

### 1.3 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌 16SrDNA 扩增和测序

以上述提取的DNA为模板，使用携带Barcode序列的上游引物338 F (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3')和下游引物806 R (5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3')对16S rDNA的V3~V4可变区进行PCR扩增。PCR反应体系为：2  $\times$  Pro Taq 10  $\mu\text{L}$ ，上游引物(5  $\mu\text{M}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ，下游引物(5  $\mu\text{M}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ，模板DNA 10 ng/ $\mu\text{L}$ ，补ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min，27个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s)，然后72 $^{\circ}\text{C}$ 稳定延伸10 min，最后在4 $^{\circ}\text{C}$ 进行保存(PCR仪：ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700型)。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。使用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)纯化，并用Quantus<sup>™</sup> Fluorometer (Promega, USA)对回收产物进行检测定量。使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit对纯化后的PCR产物进行建库：(1)接头链接；(2)使用磁珠筛选去除接头自连片段；(3)利用PCR扩增进行文库模板的富集；(4)磁珠回收PCR产物得到最终的文库。利用Illumina MiSeq PE 300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

### 1.4 数据分析

使用fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.19.6)软件对双端原始测序序列进行质控，FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/software/>

flash, version 1.2.11)软件对双端测序序列进行拼接，过滤低质量序列和无法比对到16S rDNA数据库的序列，QIIME(版本1.9.0)读取拼接后的序列，并进行Tags过滤，使用Usearch(version 1.11.1)对处理后得到的clean tags序列与数据库比对，去除嵌合体序列，得到最终有效数据(Valid tags)。利用QIIME软件的cluster方法根据97%的相似度对质控拼接后的序列进行同源比对并聚类成分类单元OTUs(Operational taxonomic units)，并剔除嵌合体，去除所有样品中注释到叶绿体和线粒体序列。使用SILVA138对各个数据集进行物种注释分析，并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。使用PICRUSt2(version 2.2.0)软件进行细菌群落代谢功能预测分析。实验数据用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示，各样品肠道细菌组成和细菌群落功能分析中，多组数据间利用Origin单因素方差分析(One-way ANOVA)，两两数据间的比较使用独立样本T检验进行分析( $P<0.05$ 表明有显著差异)；为确定各组间的微生物是否存在显著统计学差异，进行了Kruskal-Wallis秩和检验，并将 $P<0.05$ 视为统计学显著性。采用mothur软件(<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算Alpha多样性Chao、Shannon指数等，并采用Kruskal-Wallis H检验进行Alpha多样性的组间差异分析。使用基于bray-curtis距离算法的PCoA分析(主坐标分析)检验样本间微生物群落结构的相似性。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌基因组测序结果

在对番茄潜叶蛾1~4龄幼虫肠道细菌16S rDNA的V3~V4区域测序后，共产生了954 344条有效序列(Valid reads)，平均序列长度从409 bp到420 bp不等。根据97%的相似度对所有序列同源比对聚类成的OTU平均数量从188个到404个不等，1龄幼虫的OTU数量明显最高(表1)。提取的番茄潜叶蛾肠道细菌基因组DNA的质量数据显示已达到后续试验的标准(表2)。

表1 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌 16S rDNA 测序后过滤数据

Table 1 Post-filtering analysis of sequencing data for the gut bacterial 16S rRNA gene in *Tuta absoluta* larvae

样品 Samples	有效序列 Valid reads	平均长度(bp) Average length	最大长度(bp) Max length	最小长度(bp) Min length	OTU 数量(个) Number of OTUs
L1	255446	414	510	262	404
L2	257034	409	518	262	401
L3	189312	411	527	235	216
L4	252552	420	444	258	188

注: L1, 1龄幼虫; L2, 2龄幼虫; L3, 3龄幼虫; L4, 4龄幼虫。Note: L1, 1<sup>st</sup> instar larvae; L2, 2<sup>nd</sup> instar larvae; L3, 3<sup>rd</sup> instar larvae; L4, 4<sup>th</sup> instar larvae.

表2 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌DNA质量数据

Table 2 DNA quality data of gut bacteria from *Tuta absoluta* larvae

样品 Samples	浓度 (ng/ $\mu$ L) Concentration	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> / OD <sub>230</sub>	PCR 扩增结果 PCR amplification results
L1_1	3.80	1.93	0.15	A
L1_2	1.90	2.57	0.15	A
L1_3	5.22	1.48	0.20	A
L2_1	2.60	1.96	0.12	A
L2_2	4.00	2.15	0.16	A
L2_3	5.14	1.67	0.32	A
L3_1	3.21	2.10	0.22	A
L3_2	4.76	1.46	0.37	A
L3_3	4.40	1.76	0.29	A
L4_1	7.20	1.79	0.36	A
L4_2	8.40	1.89	0.37	A
L4_3	5.07	1.83	0.47	A

注: PCR 扩增结果 A 表示 PCR 产物目的条带大小正确, 浓度合适, 可进行后续实验。Note: The PCR amplification results indicated that the destination band of the PCR products was of the appropriate size and concentration for subsequent experiments.

物种累积曲线结果显示, 随着样本量的增加, 曲线由陡然上升趋向平缓, 随后进入平台期 (图 1), 说明本次试验样本量充分, 可以反映细菌群落的物种组成。

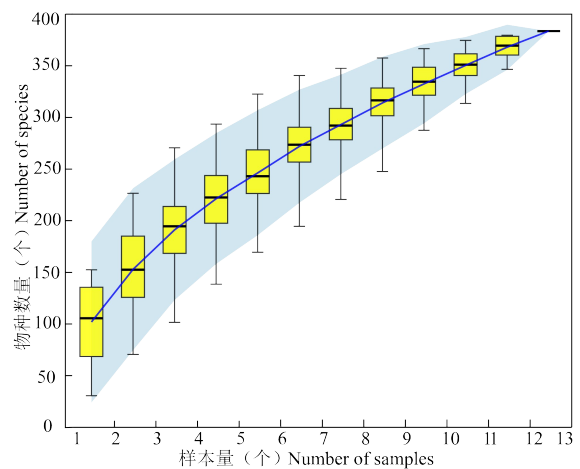


图1 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌物种累积曲线

Fig. 1 Accumulation curves of the observed gut bacterial species in *Tuta absoluta* larvae

## 2.2 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌多样性

### 2.2.1 肠道细菌组成

韦恩图显示了不同龄期幼虫的重叠 OTU (相似度为 97%), 1龄幼虫、2龄幼虫、3龄幼虫、4龄幼虫特有的 OTUs 分别为 84 个、78 个、18 个、24 个, 分别占细菌 OTUs 总数的 21.59%、20.05%、4.63%、6.17% (图 2)。

对测序获得的序列分类分析发现, 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌在门水平上主要有变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、放线菌门 Actinobacteria 等, 其中 4 个龄期肠道细菌的优势门均为变形菌门 Proteobacteria (图 3-A)。在属水平上主要有沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*、肠杆菌属 *Enterobacter*、气微菌属 *Aeromicrobium*、肠球菌属 *Enterococcus* 等, 其中番茄潜叶蛾 1 龄、2 龄、3 龄幼虫肠道细菌中沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 均为优势属, 而 4 龄幼虫肠道细菌优势属为肠杆菌属 *Enterobacter* (60.13%) (图 3-B)。

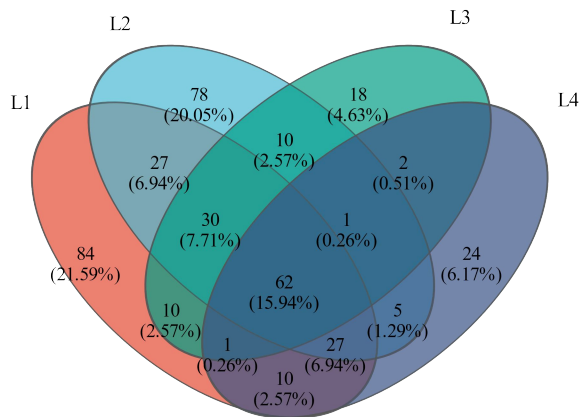


图2 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌群落 OTU 韦恩图

Fig. 2 Venn diagram illustrating the OTUs of the bacterial community in *Tuta absoluta* larvae at different developmental stages

注: L1, 1 龄幼虫; L2, 2 龄幼虫; L3, 3 龄幼虫; L4, 4 龄幼虫。Note: L1, 1<sup>st</sup> instar larvae; L2, 2<sup>nd</sup> instar larvae; L3, 3<sup>rd</sup> instar larvae; L4, 4<sup>th</sup> instar larvae.

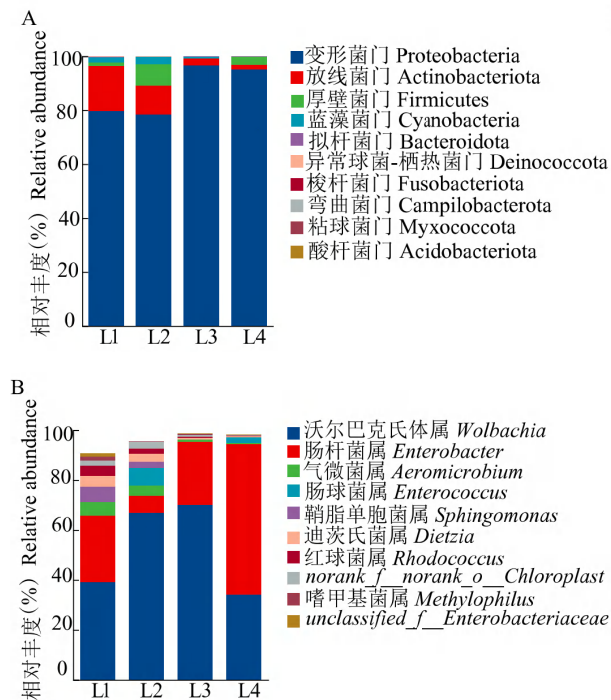


图3 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌群落的组成

Fig. 3 Composition of bacterial communities in the gut of *Tuta absoluta* larvae at different developmental stages

注: A, 门水平; B, 属水平; L1, 1 龄幼虫; L2, 2 龄幼虫; L3, 3 龄幼虫; L4, 4 龄幼虫。Note: A, Phylum level; B, Genus level; L1, 1<sup>st</sup> instar larvae; L2, 2<sup>nd</sup> instar larvae; L3, 3<sup>rd</sup> instar larvae; L4, 4<sup>th</sup> instar larvae.

对不同龄期番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌群落之间的物种进行差异显著性检验, 结果显示, 气微菌属 *Aeromicrobium*、鞘脂单胞菌属 *Sphingomonas*、迪茨氏菌属 *Dietzia*、红球菌属 *Rhodococcus* 的丰度在 1~4 龄幼虫肠道里存在显著差异, 且丰度均为 1 龄 > 2 龄 > 3 龄 > 4 龄 (图 4)。

### 2.2.2 Alpha 多样性

比较不同龄期番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌多样性指数, 发现 1 龄幼虫肠道细菌的 Shannon 指数最高, Simpson 指数最低, 说明 1 龄幼虫肠道细菌群落的多样性最高。1 龄幼虫肠道细菌的 ACE 指数、Chao 指数最高, 说明 1 龄幼虫肠道细菌群落的丰富度最高。另外, ACE、Chao 指数 L1 组最高, L2 组和 L3 组次之, L4 组最低, 说明番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌丰富度随龄期增加而降低 (表 3)。

对不同龄期番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌多样性指数进行组间差异检验, 可以看到 Shannon 指数 1 龄显著高于 3 龄、4 龄, Simpson 指数 1 龄显著低于 3 龄 ( $P < 0.05$ ) (图 5), 说明 1 龄幼虫的肠道细菌多样性显著高于 3 龄、4 龄。

### 2.2.3 Beta 多样性

在 OTU 水平上, 对各样品进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PcoA)。结果发现, L3 组和 L4 组间样本分布相近, 与 L1 组和 L2 组样本距离较远, 说明 3 龄和 4 龄幼虫肠道细菌相似, 与 1 龄和 2 龄组样本间差异较大, 由此可见不同龄期对幼虫肠道细菌结构组成有影响。另外 L4 组各样本间距离最近, 分布均匀, 说明其肠道菌群组成结构在个体间的差异较小, 其次为 L2 组, L1 组和 L3 组的肠道细菌组内各样本距离分散, 其肠道菌群组成结构在个体间的差异较大 (图 6)。

### 2.3 菌群功能预测

利用 KEGG 数据库对不同龄期的番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌进行基因功能预测分析 (图 7), 注释到的功能主要包括: 全局和概述图谱 (Global and overview maps)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢 (Amino acid metabolism)、能量代谢 (Energy metabolism)、辅因子和维生素的代谢 (Metabolism of cofactors and vitamins)、翻译 (Translation)、膜转运 (Membrane transport)、复制和修复 (Replication and repair)、核苷酸代谢 (Nucleotide metabolism)、信号转导 (Signal transduction) 等。

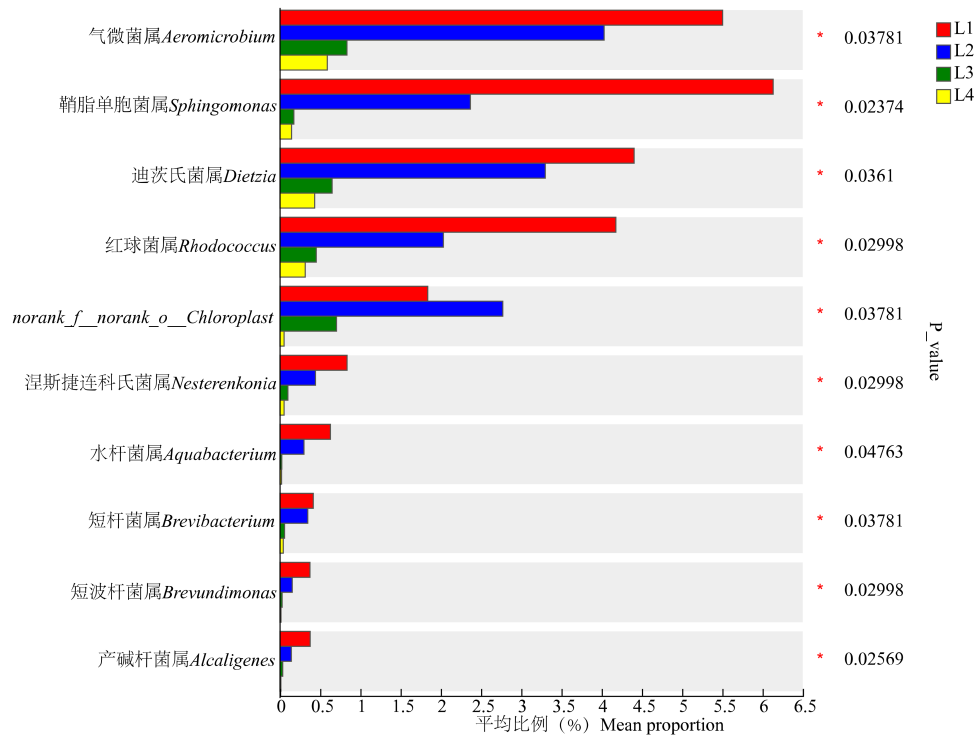


图4 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌组间物种差异显著性检验

Fig. 4 Significance test of species differences among gut bacterial groups of *Tuta absoluta* larvae

注：Y轴表示属水平下的物种名，X轴表示物种不同分组中平均相对丰度。最右边为P值，\*， $P \leq 0.05$ ；\*\*， $P \leq 0.01$ 。

Note: The Y-axis displays species names categorized at the genus level, while the X-axis represented the average relative abundance of various species groups. The P-value was displayed on the far right, \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ .

表3 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌 Alpha 多样性分析

Table 3 Analysis of gut bacterial Alpha diversity of *Tuta absoluta* larvae

样品 Samples	丰富度 Richness		多样性 Diversity	
	ACE	Chao	Shannon	Simpson
L1	135.86 ± 26.63 a	137.70 ± 28.97 a	1.99 ± 0.15 a	0.27 ± 0.03 b
L2	133.73 ± 22.85 a	132.48 ± 22.26 ab	1.32 ± 0.36 b	0.49 ± 0.15 ab
L3	89.51 ± 13.96 a	85.66 ± 12.94 bc	0.60 ± 0.51 c	0.74 ± 0.28 a
L4	86.07 ± 35.61 a	78.40 ± 35.47 c	1.02 ± 0.25 bc	0.51 ± 0.14 ab

注：图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示各处理经单因素方差分析法检验差异显著 ( $P < 0.05$ )。L1, 1龄幼虫；L2, 2龄幼虫；L3, 3龄幼虫；L4, 4龄幼虫。Note: Data were mean ± SE. The different lowercase letters indicated significant difference among different treatments by one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). L1, 1<sup>st</sup> instar larvae; L2, 2<sup>nd</sup> instar larvae; L3, 3<sup>rd</sup> instar larvae; L4, 4<sup>th</sup> instar larvae.

通过番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌基因功能差异分析，发现KEGG一级通路注释水平下不同龄期幼虫在新陈代谢功能上有显著差异，1龄的功能基因比例明显高于3龄、4龄（图8-A）。KEGG二级通路注释水平下不同龄期幼虫在全局和概述图谱功

能上有显著差异，1龄的功能基因比例明显高于3龄、4龄（图8-B）。KEGG三级通路注释水平下不同龄期幼虫在不同环境中的微生物代谢功能上有显著差异，1龄功能基因比例明显高于3龄（图8-C）。

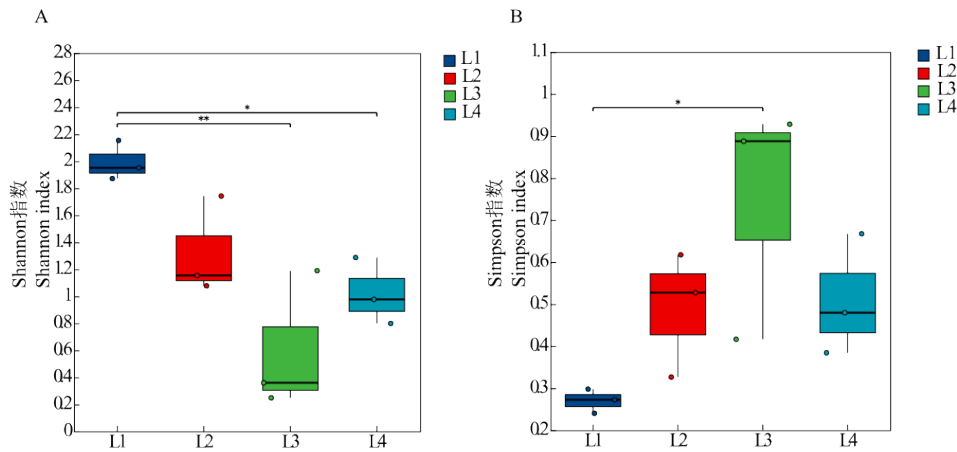


图5 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌多样性指数组间差异检验

Fig. 5 Significance tests for intergroup differences in gut bacterial diversity indices of *Tuta absoluta* larvae at different ages

注: A, Shannon指数组间差异检验; B, Simpson指数组间差异检验; 星号代表有显著性差异, \*,  $P \leq 0.05$ , \*\*,  $P \leq 0.01$ 。

Note: The asterisk represented significant differences, \*,  $P \leq 0.05$ , \*\*,  $P \leq 0.01$ .

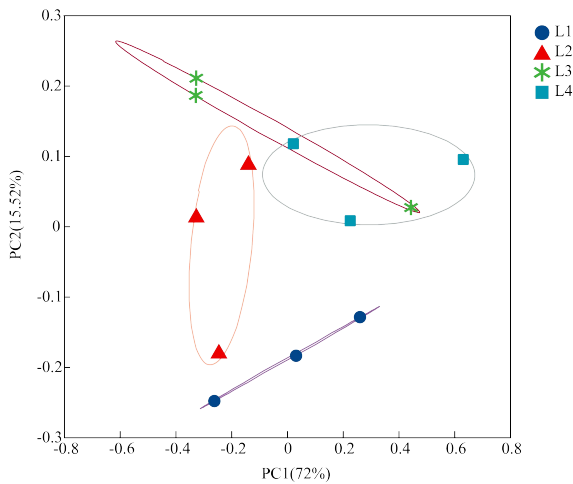


图6 番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌OTU分类水平的PcoA分析

Fig. 6 PCoA was performed on the OTU classification levels of gut bacteria in *Tuta absoluta* larvae

注: 图中不同的点表示不同的样本, 点与点之间的距离反映样本间的差异, 距离越远说明细菌群落结构差异越大, 反之越小。Note: Each point represented a different sample, and the distance between points indicated the degree of difference in bacterial community structure. A greater distance between points signifies a more substantial difference in community composition, while a shorter distance suggests greater similarity.

### 3 结论与讨论

本研究对不同发育龄期番茄潜叶蛾幼虫的肠道细菌多样性和丰富度进行研究。在肠道细菌的

组成上, 门级阶元主要有变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、放线菌门 Actinobacteria 等。其中 4 个龄期肠道细菌的优势门均为变形菌门 Proteobacteria, 这与多数昆虫肠道优势菌相同, 如桉树枝瘿姬小蜂 *Leptocybe invasa* (郭春晖等, 2022)、菜粉蝶 *Pieris rapae* (Robinson *et al.*, 2010)、云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* (Landry *et al.*, 2015)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (Xia *et al.*, 2013)。变形菌门细菌可以消化昆虫寄主植物的次级代谢产物(如萜类、生物碱、苷类和酚类化合物), 有助于维持昆虫的生长和发育(常吕恕等, 2023)。放线菌门在草地贪夜蛾和松异舟蛾 *Thaumetopoea pityocampa* 肠道中大量存在, 主要为宿主提供营养, 也有研究显示放线菌能保护宿主昆虫免受有害微生物的侵害 (Ugwu and Asiegbu, 2021)。厚壁菌门在宿主的碳水化合物代谢、氨基酸代谢和膜运输途径中发挥着关键作用 (Yuan *et al.*, 2021)。在属水平上主要有沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*、肠杆菌属 *Enterobacter*、气微菌属 *Aeromicrobium*、肠球菌属 *Enterococcus* 等, 其中 1 龄、2 龄、3 龄番茄潜叶蛾肠道细菌中沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 均为优势属, 而 4 龄幼虫肠道细菌优势属为肠杆菌属 *Enterobacter* (60.13%)。有研究表明沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 可调控宿主昆虫的生殖方式、可对宿主昆虫的休眠等行为产生影响 (Shao *et al.*, 2024), 也可提高宿主的繁殖力 (Zhang *et al.*, 2021)。随着对沃尔巴克氏体研究的

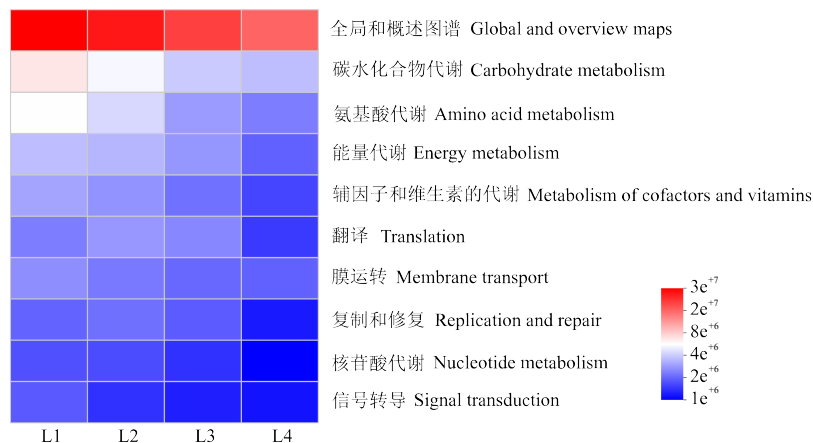


图7 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌基因功能KEGG二级通路注释

Fig. 7 Annotations of the KEGG secondary pathways for gut bacterial gene functions were conducted on *Tuta absoluta* larvae across different age groups

注：通过色块颜色梯度来展示组别中不同功能丰度变化情况，数值越大，代表功能丰度越高。Note: The color gradient of the blocks was utilized to illustrate changes in functional abundance across different groups. A higher value corresponds to greater functional abundance.

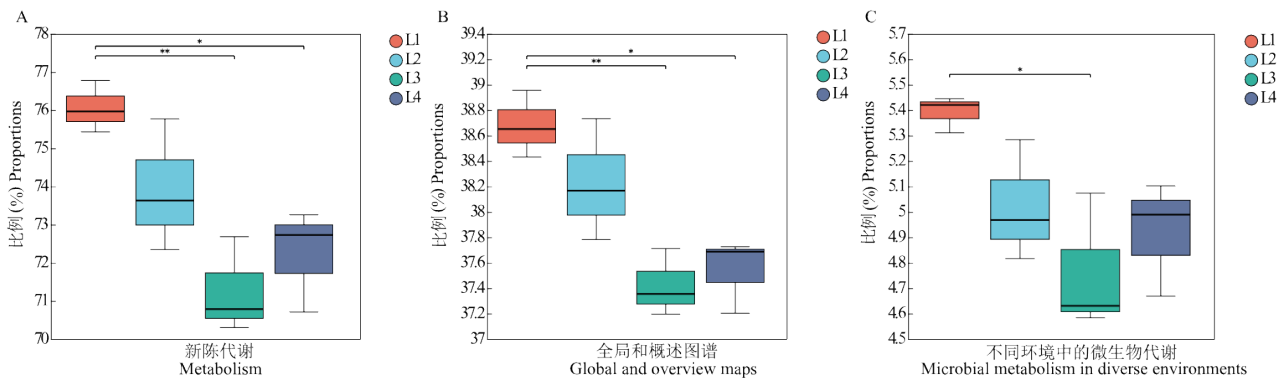


图8 番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌基因功能差异分析

Fig. 8 Analysis of functional differences in gut bacterial genes among *Tuta absoluta* larvae at various age stages.

注：A，KEGG一级通路注释水平；B，KEGG二级通路注释水平；C，KEGG三级通路注释水平。星号代表有显著性差异，\*， $P \leq 0.05$ ，\*\*， $P \leq 0.01$ 。Note: A, KEGG primary pathway annotation level; B, KEGG secondary pathway annotation level; C, KEGG three-level pathway annotation level. The asterisk represented significant differences, \*,  $P \leq 0.05$ , \*\*,  $P \leq 0.01$ .

不断深入，其与宿主之间相互关系的潜在利用价值不断被挖掘。然而本试验的结果尚不能说明它发挥的作用以及它与宿主之间的相互关系，需要通过宏基因组等方法结合番茄潜叶蛾的生长发育情况来研究。肠杆菌属能对特定食物进行消化且能对进入昆虫肠道的有毒酚类进行降解 (Bevins and Salzman, 2011)。4龄肠道细菌优势属为肠杆菌属，与草地贪夜蛾末龄幼虫的肠杆菌相对丰度较高结果一致，末龄幼虫食欲旺盛，丰富的肠杆菌有助于宿主消化吸收 (Lu *et al.*, 2023)。

对番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌群落之

间的物种进行差异显著性检验，发现气微菌属 *Aeromicrobium*、鞘脂单胞菌属 *Sphingomonas*、迪茨氏菌属 *Dietzia*、红球菌属 *Rhodococcus* 的丰度在1~4龄幼虫肠道里存在显著差异，且丰度均为1龄最高。气微菌属是病原菌镰刀菌产生的次级代谢产物的降解菌 (侯铭萱, 2020)；鞘脂单胞菌属可用于芳香化合物的生物降解，对除虫菊酯等农药有良好的降解作用 (刘晨阳等, 2021)；迪茨氏菌对疏水类的烷烃有降解活性，对污染土壤危害植物、危害动物生长发育的磺胺类抗生素具有降解作用 (姜润, 2022)；红球菌属具有苯胺降解功能，对



多菌灵有降解作用(王志春, 2010)。综上, 可能是1龄幼虫尚不能对病原菌、农药、抗生素这些有害物质进行充分的代谢降解, 需要肠道细菌协助宿主进行这些生命活动。Hernández-Martínez等(2010)试验发现甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中肠携带的较高细菌负荷激活了宿主昆虫的免疫途径, 并将这种免疫传递给下一代, 增加了后代对苏云金芽孢杆菌的耐受性, 说明肠道微生物能在宿主昆虫不断繁衍进化过程中提高宿主的适生性。

Alpha多样性分析显示, ACE、Chao指数L1组最高, L2组和L3组次之, L4组最低, 说明番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌丰富度随龄期增加而降低。海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 晚期幼虫肠道细菌丰富度低于早期幼虫, 与本试验结果一致, 这可能是因为在最后龄期接近时, 幼虫要清除肠道内容物以化蛹(Chen *et al.*, 2016)。同时1龄幼虫肠道细菌的Shannon指数最高, Simpson指数最低, 说明1龄幼虫肠道细菌群落的多样性最高, 在对稻飞虱的研究中同样发现1龄幼虫肠道细菌多样性和丰富度均高于其他发育阶段(Yang *et al.*, 2020)。Beta多样性分析结果显示不同龄期的番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌群落结构会发生变化, 这与发育阶段可以改变草地贪夜蛾的肠道细菌结构一致(Li *et al.*, 2022)。

对番茄潜叶蛾不同龄期幼虫肠道细菌进行KEGG注释, 得到的功能有氨基酸代谢和碳水化合物代谢等, 表明番茄潜叶蛾幼虫取食时叶片中的部分营养物质可能不足以完全满足其代谢和生长发育的需要, 需要肠道微生物协助完成。例如4种以桑树为食的鳞翅目昆虫肠道细菌在碳水化合物和氨基酸代谢中发挥作用(Chen *et al.*, 2020), 海灰翅夜蛾肠道微生物群可以为宿主提供营养补充(Chen *et al.*, 2016)。上述结果表明, 番茄潜叶蛾幼虫的肠道菌群在食物消化吸收以及营养供给方面发挥重要的作用。Chen等(2020)通过代谢组学发现家蚕 *Bombyx mori* 幼虫肠道中的寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* 可以为家蚕提供必需氨基酸, 并且通过这种营养供给显著增强了家蚕的适应性, 从而使幼虫对毒死蜱的抗性增强, 有效地规避有机磷杀虫剂带来的不良影响, 说明肠道菌群可以通过营养供给增强宿主的生态适应性。

通过番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌基因功能差异分析, 发现不同龄期幼虫在KEGG一级通路新陈代

谢功能上有显著差异, 1龄功能基因比例明显高于3龄、4龄。这种差异可能与番茄潜叶蛾幼虫的生命活动有关, 对于刚开始进食的1龄幼虫来说, 新陈代谢功能基因的存在有助于宿主对食物营养利用以及宿主的生长, 而对于即将进入下一个虫态的4龄幼虫来说, 新陈代谢功能会因为宿主即将处于停止进食和形态变化的时期而减弱。本研究的PICRUSt2功能预测并不能说明这些肠道细菌真正的功能以及这些细菌对番茄潜叶蛾幼虫的生长发育的影响, 这些内容还需要通过宏基因组学或其他技术手段进一步研究, 例如可以使用抗生素扰乱昆虫肠道菌群。研究显示通过抗生素处理后, 影响了杜仲梦尼夜蛾 *Orthosia songi* 幼虫正常的肠道菌群, 从而导致蛹的羽化率降低, 幼虫的取食和消化能力降低, 对营养的利用能力减弱(郭彤彤等, 2020)。但在这个过程中, 需要考虑到是否是抗生素的直接作用产生的影响, 因此还需要将这些肠道菌回接给抗生素处理后的幼虫, 观察其是否能恢复正常的生理活动, 从而验证肠道菌群的功能。

肠道微生物不仅能影响宿主昆虫的生物学特性, 也为宿主昆虫提供多方面的功能。Zhang等(2024)将浙江美国白蛾种群幼虫的肠道菌群移植到北京美国白蛾种群幼虫体内, 发现可以帮助北京美国白蛾种群适应新的寄主, 这项研究证明了肠道菌群在入侵害虫快速适应新栖息地植物过程中发挥着重要作用, 说明肠道微生物能够协助宿主昆虫更好地适应生态系统中的生存环境。本研究为探索番茄潜叶蛾幼虫肠道细菌与宿主之间的相互作用奠定基础, 也为番茄潜叶蛾的适应性进化和综合治理提供更多的视角和方向, 不过宿主昆虫与肠道微生物的互作机制和重要意义, 以及它们如何适应复杂多变的环境有待深入研究。

## 参考文献 (References)

- Arai H, Hirano T, Akizuki N, *et al.* Multiple infection and reproductive manipulations of *Wolbachia* in *Homona magnanima* (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *Microbial Ecology*, 2018, 77 (1): 257-266.
- Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9 (5): 356-368.
- Bi S, Wang X, Tang Y, *et al.* Bacterial communities of the internal reproductive and digestive tracts of virgin and mated *Tuta absoluta*

- [J]. *Insects*, 2023, 14 (10): 779.
- Biondi A, Guedes RNC, Wan FH, *et al.* Ecology, worldwide spread, and management of the invasive south american tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, present, and future [J]. *Annual Review of Entomology*, 2018, 63 (1): 239–258.
- Chang LS, Wang WQ, Yang Y, *et al.* Study on the composition of culturable gut bacteria in the larvae of Yunnan population of *Tuta absoluta* and the degradation for macromolecular compounds [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (5): 1240–1251. [常吕恕, 王文倩, 杨韵, 等. 番茄潜叶蛾幼虫肠道可培养细菌结构组成及对大分子化合物的降解作用研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (5): 1240–1251]
- Chang LS, Yang Y, Wang WQ, *et al.* Composition, diversity and function prediction of intestinal bacteria of *Tuta absoluta* (Meyrick) larvae in potato population [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2023, 54 (1): 139–149. [常吕恕, 杨韵, 王文倩, 等. 番茄潜叶蛾马铃薯种群幼虫肠道细菌组成 结构与多样性及功能预测 [J]. 南方农业学报, 2023, 54 (1): 139–149]
- Chen BS, Teh BS, Boland W. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29505.
- Chen BS, Xie S, Zhang XC, *et al.* Gut microbiota metabolic potential correlates with body size between mulberry-feeding lepidopteran pest species [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76 (4): 1313–1323.
- Chen BS, Zhang N, Xie S, *et al.* Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides [J]. *Environment International*, 2020, 143: 105886.
- Deng JD, Wang HC, Xu WK, *et al.* Effects of different host plants on the diversity of gut bacteria of fall webworm *Hyphantria cunea* larvae [J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49 (4): 1201–1209. [邓竣丹, 王海超, 许维康, 等. 不同寄主植物对美国白蛾肠道细菌群落的影响 [J]. 植物保护学报, 2022, 49 (4): 1201–1209]
- Eski A, Erdoğan P, Demirbağ Z, *et al.* Isolation and identification of bacteria from the invasive pest *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and evaluation of their biocontrol potential [J]. *International Microbiology*, 2024, 27 (2): 631–643.
- Fu JR, Wang JH, Huang XM, *et al.* Composition and diversity of gut microbiota across developmental stages of *Spodoptera frugiperda* and its effect on the reproduction [J]. *Front Microbiol.*, 2023, 14: 1237684.
- Guo CH, Wang RR, Ma HX, *et al.* Study on the similarity of endosymbiotic bacteria among *Leptocybe invasa* and its host and parasite [J]. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2022, 50 (11): 94–100. [郭春晖, 王蕊蕊, 马洪轩, 等. 桉树枝瘿姬小蜂与寄主及寄生蜂体内细菌相似性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50 (11): 94–100]
- Guo TT, Zhu MQ, Li JP, *et al.* Composition and functions of cultural bacteria in the larval guts of *Orthosia songi* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56 (11): 124–133. [郭彤彤, 朱铭强, 李晋鹏, 等. 杜仲梦尼夜蛾幼虫肠道可培养细菌的组成及其功能 [J]. 林业科学, 2020, 56 (11): 124–133]
- Gurung K, Wertheim B, Salles JF. The microbiome of pest insects: It is not just bacteria [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2019, 167 (3): 156–170.
- Hernández-Martínez P, Naseri B, Navarro-Cerrillo G, *et al.* Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (10): 2730–2737.
- Hou M. Isolation and Characteristics and Preliminary Application of Two Zearalenone-Degrading Bacteria [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. [侯铭萱. 两株玉米赤霉烯酮降解菌筛选与特性研究及其应用初探 [D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020]
- Hu L, Sun ZX, Xu CC, *et al.* High nitrogen in maize enriches gut microbiota conferring insecticide tolerance in lepidopteran pest *Spodoptera litura* [J]. *iScience*, 2022, 25 (1): 103726.
- Jiang R. Screening and Degradation Characteristics of Sulfamethazine and Its Intermediate Degrading Strain [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2022. [姜润. 磺胺二甲嘧啶及中间产物降解菌的筛选及降解特性研究 [D]. 北京: 北京工业大学硕士学位论文, 2022]
- Kou RM, Li Y, Dou FY, *et al.* Diversity and differences of gut bacterial communities in different instar larvae and diapause prepupae of *Colletes gigas* (Hymenoptera: Colletidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64 (6): 682–693. [寇若玫, 李月, 窦飞越, 等. 大分舌蜂不同龄期幼虫及滞育预蛹肠道细菌群落多样性及其差异 [J]. 昆虫学报, 2021, 64 (6): 682–693]
- Landry M, Comeau AM, Derome N, *et al.* Composition of the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) midgut microbiota as affected by rearing conditions [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (12): e0144077.
- Li DD, Li JY, Hu ZQ, *et al.* Fall Armyworm gut bacterial diversity associated with different developmental stages, environmental habitats, and diets [J]. *Insects*, 2022, 13 (9): 762.
- Liu CY, Gao CL, Zhao Y, *et al.* Analysis of bacterial community structure of farmland planted ginseng soil based on high-throughput sequencing of 16S rDNA gene [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (5): 1731–1740. [刘晨阳, 高成林, 赵玥, 等. 基于 16SrDNA 基因高通量测序分析农田栽参土壤改良后的细菌群落结构 [J]. 分子植物育种, 2021, 19 (5): 1731–1740]
- Lu YY. Beware of the continuous spread and invasion of tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) in China [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (2): 526–528. [陆永跃. 警惕番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick) 在我国持续扩散入侵 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 526–528]
- Lv DB, Zhang YJ, He K, *et al.* Dynamics of gut microflora across the life cycle of *Spodoptera frugiperda* and its effects on the feeding and growth of larvae [J]. *Pest Management Science*, 2023, 79 (1): 173–182.
- Pilon F, Silva C, Visóto L, *et al.* Purification and characterization of

- trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatilis* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2017, 96 (2): e21407.
- Robinson CJ, Schloss P, Ramos Y, *et al.* Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59 (2): 199–211.
- Shao Y, Mason CJ, Felton GW. Toward an integrated understanding of the Lepidoptera Microbiome [J]. *Annual Review of Entomology*, 2024, 69 (1): 117–137.
- Shao YQ, Chen BS, Sun C, *et al.* Symbiont-Derived Antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota [J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24 (1): 66–75.
- Ugwu JA, Asiegbu F. Influence of host plants on the diversity of gut microbiota communities of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Research Square*, 2021.
- Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, *et al.* The generalist inside the specialist: Gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1005.
- Wang H, Xian XQ, Gu YJ, *et al.* Similar bacterial communities among different populations of a newly emerging invasive species, *Tuta absoluta* (Meyrick) [J]. *Insects*, 2022, 13 (3): 252.
- Wang Z. Identification of Carbendazim-Degrading Strain Djl-6-2 and Its Carbendazim Metabolic Pathway [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010. [王志春. 多菌灵降解菌株 djl-6-2 的鉴定及其降解多菌灵途径的研究 [D]. 南京: 南京农业大学硕士论文, 2010]
- Xia XF, Gurr GM, Vasseur L, *et al.* Metagenomic sequencing of diamondback moth gut microbiome unveils key holobiont adaptations for herbivory [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 633.
- Xia XF, Zheng DD, Zhong HZ, *et al.* DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (7): e68852.
- Yang YJ, Liu XG, Xu HX, *et al.* The abundance and diversity of gut bacteria of rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) across life stages [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2020, 23 (2): 430–438.
- Yang YX, Zhou ZX, Qian XJ, *et al.* Effects of feeding four host plants on midgut bacteria of *Tuta absoluta* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024, 40 (4): 776–786. [杨亚贤, 周昭旭, 钱秀娟, 等. 取食四种寄主植物对番茄潜叶蛾中肠肠道细菌的影响 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40 (4): 776–786]
- Yuan XQ, Zhang X, Liu XY, *et al.* Comparison of gut bacterial communities of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) reared on different host plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (13): 6843.
- Zhang GF, Ma DY, Liu WX, *et al.* The arrival of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in China [J]. *Journal of Biosafety*, 2019, 28 (3): 200–203. [张桂芬, 马德英, 刘万学, 等. 中国新发现外来入侵害虫南美番茄潜叶蛾(鳞翅目麦蛾科) [J]. 生物安全学报, 2019, 28 (3): 200–203]
- Zhang SK, Song F, Wang J, *et al.* Gut microbiota facilitate adaptation of invasive moths to new host plants [J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2024, 18 (1): wrae031.
- Zhang Y, Liu S, Jiang R, *et al.* *Wolbachia* strain wGri from the tea geometrid moth *Ectropis griseascens* contributes to its host's fecundity [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 694466.