

研究报告

不同食物调控下烟草甲幼虫肠道菌群多样性的解析

万子凌¹, 李艳青¹, 李昂¹, 彭琛², 梁增发², 黄嘉杰², 金丰良^{1*}, 许小霞^{1*}

1 华南农业大学 植物保护学院 绿色农药全国重点实验室, 广东 广州 510642

2 广东中烟工业有限责任公司, 广东 广州 510385

万子凌, 李艳青, 李昂, 彭琛, 梁增发, 黄嘉杰, 金丰良, 许小霞. 不同食物调控下烟草甲幼虫肠道菌群多样性的解析[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 271-293.

WAN Ziling, LI Yanqing, LI Ang, PENG Chen, LIANG Zengfa, HUANG Jiajie, JIN Fengliang, XU Xiaoxia. Consuming different diets affects the gut bacterial diversity of *Lasioderma serricorne* larvae[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 271-293.

摘要: 【背景】昆虫肠道细菌在宿主的发育、营养代谢及免疫防御中发挥关键作用, 其群落组成受食物来源显著影响。然而, 不同食料条件下烟草甲(*Lasioderma serricorne*)幼虫肠道菌群多样性的研究尚不充分。【目的】解析烟草甲幼虫肠道细菌多样性与其食源的内在关联, 并对可培养共生菌进行分离鉴定。【方法】基于 PacBio SMRT 平台的 16S rRNA 基因全长测序分析人工饲料组(SL 组)、烟草驯化组(YC 组)及野生环境组(WF 组)烟草甲幼虫肠道细菌的群落结构。通过 RT-qPCR 技术研究肠杆菌属(*Enterobacter*)、沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)和杀雄菌属(*Arsenophonus*)这 3 种共生菌在 3 种不同食料条件下的表达量变化。同时, 使用 4 种功能各异的培养基进行体外分离培养, 筛选并鉴定出可培养的优势菌群。【结果】三组肠道菌群 OTU 数量差异显著(SL 组 174 个、YC 组 115 个、WF 组 62 个)。α 多样性指数表明组间差异显著(SL>YC>WF, $P<0.05$)。属水平上, SL 组优势菌为 *Enterobacter* (61.43%)、*Wolbachia* (13.12%)和肠球菌属(*Enterococcus*) (19.34%); YC 组以 *Wolbachia* (87.09%)和 *Enterococcus* (11.88%)为主; WF 组则以 *Arsenophonus* (97.91%)为绝对优势菌。RT-qPCR 定量结果进一步验证了 *Enterobacter*、*Wolbachia* 及 *Arsenophonus* 在 3 组中的表达量差异。通过 4 种功能培养基的分离培养, 获得 13 株可培养菌株并构建系统发育树, 鉴定为泛菌属(*Pantoea*) (SL1, YC5)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (SL6, YC1, WF2, WF8, WF10)、*Enterobacter* (CB2)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*) (SL5, YC3)及 *Enterococcus* (WF6, YCL, WFL)。【结论】本研究通过多维分析阐明了食源对烟草甲幼虫肠道菌群结构的塑造作用, 为基于肠道微生物调控的害虫绿色防控策略提供了新思路。

关键词: 烟草甲; 共生细菌; 群落结构; 细菌分离

资助项目: 广东省自然科学基金(2023A1515010305); 广东中烟工业有限责任公司(粤烟工[2021]科字第 031 号)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2023A1515010305) and the Project of Guangdong China Tobacco Industry Co., Ltd. (GDTP1 [2021] Science & Technology 031).

*Corresponding authors. E-mail: XU Xiaoxia, xuxiaoxia111@scau.edu.cn; JIN Fengliang, jflbang@scau.edu.cn

Received: 2025-06-07; Accepted: 2025-07-28; Published online: 2025-08-12

Consuming different diets affects the gut bacterial diversity of *Lasioderma serricorne* larvae

WAN Ziling¹, LI Yanqing¹, LI Ang¹, PENG Chen², LIANG Zengfa², HUANG Jiajie², JIN Fengliang^{1*}, XU Xiaoxia^{1*}

1 State Key Laboratory of Green Pesticides, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 China Tobacco Guangdong Industrial Co., Ltd., Guangzhou 510385, Guangdong, China

Abstract: [Background] Gut bacteria play crucial roles in the development, nutrient metabolism, and immune defenses of host insects, with their community composition being significantly influenced by diet sources. However, the research on the diversity of gut microbiota in *Lasioderma serricorne* larvae under different dietary conditions remains limited. [Objective] To elucidate the intrinsic relationship between gut bacterial diversity and diet sources in *L. serricorne* larvae and isolate and identify culturable symbiotic bacteria. [Methods] Full-length 16S rRNA gene sequencing was performed on the PacBio SMRT platform to analyze the community structure of gut bacteria in *L. serricorne* larvae in the artificial feed (SL) group, tobacco domestication (YC) group, and wild environment (WF) group. RT-qPCR was employed to quantify the expression levels of three symbiotic bacteria, *Enterobacter*, *Wolbachia*, and *Arsenophonus*, under the three dietary conditions. Culturable dominant bacteria were isolated and identified via four functionally distinct media. [Results] The number of gut microbiota OTUs varied significantly among different groups (SL: 174 OTUs; YC: 115 OTUs; WF: 62 OTUs). Alpha diversity indices confirmed significant intergroup differences (SL>YC>WF, $P<0.05$). At the genus level, the dominant bacteria were *Enterobacter* (61.43%), *Wolbachia* (13.12%), and *Enterococcus* (19.34%) in the SL group, *Wolbachia* (87.09%) and *Enterococcus* (11.88%) in the YC group, and *Arsenophonus* (97.91%) in the WF group. RT-qPCR validated the differential expression of *Enterobacter*, *Wolbachia*, and *Arsenophonus* across groups. Thirteen culturable strains were isolated and phylogenetically identified as *Pantoea* (SL1 and YC5), *Acinetobacter* (SL6, YC1, WF2, WF8, and WF10), *Enterobacter* (CB2), *Exiguobacterium* (SL5 and YC3), and *Enterococcus* (WF6, YCL, and WFL). [Conclusion] This multi-dimensional analysis demonstrates how diets shape the gut microbiota structure of *L. serricorne* larvae, providing new insights for developing gut microbiota-based eco-friendly strategies for pest management.

Keywords: *Lasioderma serricorne*; symbiotic bacteria; community structure; bacterial isolation

烟草甲(*Lasioderma serricorne*)属于鞘翅目窃蠹科,是一种完全变态昆虫。其食性非常广泛,主要危害贮存中的烟草、禾谷类、豆类及动植物标本,其中以烟叶及烟叶制品的受害最为严重^[1]。作为烟叶仓储行业的主要害虫,烟草甲主要在幼虫期对烟叶造成危害。该昆虫特

别倾向于蛀食贮存 1–2 年并处于醇化过程中的中等烟叶。幼虫藏匿于烟叶的皱褶处,蛀食烟叶,造成穿孔和破碎。取食所产生的虫粪、虫尸和虫蜕混杂在烟叶中,严重影响了烟叶的品质^[2]。在我国,由烟草甲造成的经济损失约占贮烟害虫总损失的 98%以上^[3]。据报道,全球

范围内,烟草甲对烟草产业造成的经济损失超过 3 亿美元^[4]。鉴于烟草甲的危害程度和广泛分布对全球烟草经济造成的巨大影响,如何有效且绿色地防治烟草甲已成为当前烟草行业的重要议题。目前,烟草甲的防控主要依赖化学防治方法。虽然这些方法效率较高,但容易对环境造成污染,并影响非靶标生物,包括其他昆虫和人类健康。因此,使用微生物方法防治害虫显得尤为重要。这些方法具有较强的专一性,不易产生抗药性,对人类和生态环境是绿色的选择。

昆虫共生菌是指存在于昆虫肠道特定部位的微生物。这些共生菌在昆虫宿主中发挥着重要作用,包括影响昆虫的发育^[5-6]、参与能量代谢、生成宿主所需的氨基酸^[7]、协助昆虫适应寄主植物^[8-9]、抵御天敌^[10]、增强抗药性^[11],以及帮助昆虫消化植物产生的次级代谢产物^[12]等基本生命过程。因此,共生菌被视为宿主昆虫不可或缺的“重要器官”^[13-14]。共生菌可分为初级和次级两类。初级共生菌通过垂直传递影响宿主的存活和繁殖。次级共生菌则既可以通过垂直传递,也可以在同一代的不同个体之间进行水平传递,从而影响宿主对环境的适应性^[15]。研究表明,食物能够通过改变昆虫肠道的菌群结构影响幼虫的生长发育速度^[16]。昆虫通过取食获得的微生物菌落是其常驻菌群的重要来源,这些微生物菌落还参与宿主以外的代谢活动。不同寄主植物的棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hubner)幼虫肠道菌群组成存在显著差异^[17]。其肠道菌群与取食的寄主植物叶际细菌群落相似。例如,取食茄子(*Solanum melongena* Linn)的茄二十八星瓢虫(*Epilachna vigintioctopunctata* Bielawski)的肠道优势菌群为乳球菌属(*Lactococcus*),该菌群的基因功能预测涉及植物次生代谢产物的降解和氨基酸的代谢途径^[18]。与此不同,取食龙葵(*Solanum nigrum* Linn)的茄二十八星瓢虫的肠道菌群主要由苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)构成,其基因功能预测更多涉

及维生素代谢^[19]。这说明棉铃虫和茄二十八星瓢虫的肠道菌群与其取食的植物密切相关。

烟草(*Nicotiana tabacum* Linn)中含有大量以烟碱为主的生物碱,这些生物碱对大多数动物具有剧毒。然而,烟草甲能够顺利取食并完成整个生命周期,这一过程得益于其肠道内的微生物。研究表明,烟草甲的菌胞体内存在一种类似酵母的共生菌(yeast-like symbiont, YLS), YLS 能够产生水解酶,对广谱性杀虫剂、真菌毒素和植物毒素进行解毒,从而促进烟草甲的存活与生长^[20-23]。不同的食料对烟草甲的生长发育及共生菌 YLS 的数量有明显影响^[24]。然而,烟草甲的细菌微生物群和细菌群落结构随食物来源变化的情况尚未得到充分研究。由于以往对烟草甲的研究多集中在生活史等方面,对其肠道微生物的研究较少,因此,本研究基于 PacBio SMRT 测序平台,采用 16S rRNA 基因全长扩增子测序技术,测定烟草甲幼虫在人工饲料组(SL 组)、烟草驯化组(YC 组)及野生环境组(WF 组)这 3 种食料下的肠道微生物并进行分析和鉴定,以期为进一步探讨其主要微生物对烟草甲生命活动的影响奠定基础,并为进一步解析烟草甲肠道细菌与食物之间的相互关系提供理论参考,同时为仓储烟叶的生物保护提供新方向。

1 材料与方法

1.1 样品

烟草甲均采集自广东中烟工业有限责任公司烟叶贮藏仓库,饲养于华南农业大学绿色农药全国重点实验室。烟叶来自广东中烟工业有限责任公司烟叶贮藏仓库。实验虫源分为 3 组:野生环境组(WF);人工饲料组(SL):使用人工饲料(小麦粉:麦麸:酵母粉=14:4:2)连续饲养 10 代以上;烟草驯化组(YC):使用烟草驯化饲料(烟草粉末:麦麸=16:4)连续饲养 10 代以上。所有烟草甲均在人工气候培养箱中培养,培养条件为:温度(29±0.5) °C,相对湿度(60±5)% ,全黑暗。

实验所用烟草甲已在上述实验室条件下连续饲养超过 15 代。

烟草甲的传代方法：利用吸虫器随机吸取 50 头烟草甲成虫，投放到新配制的食料中，每日观察烟草甲成虫状态，待成虫全部死亡后，将成虫尸体全部吸出，以保证食料盒中新生烟草甲全部为下一代，重复 15 次以上后得到稳定遗传的烟草甲。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L)^[25]：胰蛋白胨 10.0，酵母粉 5.0，NaCl 10.0，琼脂粉 15.0 (固体培养基加入)，pH 7.0。

烟碱培养基：K₂HPO₄ 13.3 g，KH₂PO₄ 4.0 g，MgSO₄·7H₂O 0.2 g，微量元素溶液 0.5 mL，琼脂 18.0 g，pH 7.0，蒸馏水定容至 1 L。121 °C 灭菌 20 min，冷却至 70 °C，加入 2.2 mL 纯度为 90% 的液体烟碱(用 0.22 μm 滤膜过滤)，摇匀，在超净工作台倒平板，封口膜封口置于 4 °C 保存备用。

烟草浸出液培养基：将 50 g 去茎烟叶放入 1 L 蒸馏水中，加热至沸腾 20 min，冷却后用 4 层纱布过滤烟叶得烟草浸出液。在 40 mL 烟草浸出液中加入 160 mL 蒸馏水及 3 g 琼脂粉。

刚果红纤维素培养基(g/L)：纤维素 5.0，Na₂HPO₄ 1.2，NaH₂PO₄ 0.9，NaNO₃ 1.0，MgSO₄ 0.5，KCl 0.5，酵母粉 0.5，酸水解酪蛋白 0.5，刚果红 0.2，琼脂粉 18.0。

1.3 主要试剂和仪器

粪便/土壤基因组 DNA 提取试剂盒、2×Rapid Taq Master Mix 和 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；引物由广州擎科生物科技有限公司合成。PBS 缓冲液(g/L)：NaCl 8.00，KCl 0.20，Na₂HPO₄·12H₂O 3.63，KH₂PO₄ 0.24，pH 7.4。

实时荧光定量 PCR 仪、恒压恒流电泳仪和 PCR 仪，Bio-Rad 公司。

1.4 烟草甲肠道样品收集

从 SL 组和 YC 组各取 6 个生物学重复，每个重复包含 15 头龄期一致的幼虫。从 WF 组取

3 个生物学重复，每个重复包含 15 头龄期一致的幼虫。用 75%乙醇浸泡幼虫 30 s，随后用 ddH₂O 冲洗 3 次以去除残留乙醇。在超净工作台上解剖幼虫，取出完整肠道。将 15 条肠道迅速转移至含有 150 μL PBS 缓冲液的 1.5 mL 无菌离心管中。立即投入液氮中速冻，随后转移至 -80 °C 长期保存备用。

1.5 烟草甲幼虫微生物的建库测序

按照粪便/土壤基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取烟草甲幼虫肠道细菌总 DNA。以提取的 DNA 作为模板，使用 16S rRNA 基因特异性引物 F (5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') 和 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL，DNA 1 μL，ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件：95 °C 3 min；95 °C 15 s，55 °C 15 s，72 °C 15 s，30 个循环；72 °C 5 min。每个样本进行 3 次重复，采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的长度和浓度。质检合格的样本储存在 -80 °C 备用。随后，对 PCR 产物进行纯化、定量和均一化处理，以构建测序文库(SMRT Bell)。文库质检后，使用 PacBio 平台进行测序。测序数据以 BAM 格式输出，通过 SMRT Link 分析软件导出 CCS 文件，根据 barcode 序列识别不同样品的数据，并转换为 FASTQ 格式。以上工作由康圣序源生物科技(武汉)有限公司进行。

1.6 测序数据处理分析

三组样品的全长微生物多样性扩增测序获得了 HiFi 数据。对原始测序序列进行了质控处理，包括低质量过滤和长度过滤，从而得到高质量序列。将 HiFi 序列进行聚类 and 去噪，划分为 OTUs/ASVs (以下统一称为 Feature)，并根据 Feature 的序列组成进行物种分类。基于 Feature 分析结果，对样品在各个分类水平上进行分类学分析，并获得各样品在门纲目科属种分类学水平上的群落结构图、物种聚类热图、分类学水平系统发育树及分类学树状图。

1.7 微生物群落结构多样性分析

基于计算获得的距离矩阵进行以下分析来揭示不同样本组间微生物群落结构的差异。Alpha 多样性反映的是单个样品物种丰富度及物种多样性,有多种衡量指标:sobs、Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Pielou。Chao1 和 Ace 指数衡量物种丰富度即物种数量的多少。Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性,受样品群落中物种丰富度和物种均匀度的影响。Beta 多样性分析,比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。采用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA)构建样本层次聚类树。应用非度量多维尺度分析(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS)对样本进行排序。主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)通过特征值分解将样本间的距离差异信息转化为低维空间中的坐标(主坐标),使得样本点在该空间中的欧几里得距离平方尽可能接近原始距离矩阵。利用相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM),对多维度数据组间相似性进行分析。计算并绘制基于不同距离度量的组内和组间距离分布箱线图,以可视化比较各组内部及组间微生物群落组成的离散度和差异程度。使用 STAMP 软件对不同分组间物种(如 OTU、属、种等)的丰度进行差异显著性检验,对于注释到的物种数目>20 的类别(大样本)采用 G 检验。对于注释到的物种数目≤20 的类别(小样本)采用 Fisher's exact test。对需要比较的不同组别进行两两 *t* 检验(参数检验,假设数据符合正态分布和方差齐性)。设定 $P<0.05$ 为统计显著性差异的标准。

1.8 肠道共生菌的分离与鉴定

从 SL 组、YC 组和 WF 组中各选取 15 头生长状况良好的三龄烟草甲幼虫,进行 24 h 的饥饿处理后,用毛笔清除幼虫体表的食物碎屑,随后依次用 75%酒精浸泡 30 s,蒸馏水浸泡 15 s,此过程重复 3 次。用吸水纸吸干水分后备用。在超净工作台上解剖烟草甲幼虫,迅速将肠道

样本放入含有 150 μL PBS 缓冲液的 1.5 mL 离心管中,SL 组、YC 组和 WF 组各一管,每管放入 15 条完整的烟草甲肠道。使用研磨棒在冰上研磨至匀浆后,将研磨液稀释至 10^{-4} 浓度,分别吸取 100 μL 滴加在 LB 培养基、纤维素培养基、2.0 g/L 烟碱培养基和 2.0 g/L 烟草浸出液培养基上。

将接种后的培养基置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后,选取生长良好的单菌落在新鲜 LB 平板上进行 3 代划线纯化。将纯化后的单菌落接种至 1 mL 新鲜 LB 液体培养基中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h。取 300 μL 菌液与 700 μL 50%甘油混合,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保藏。同时,取 200 μL 菌液送至广州擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。将获得的测序序列在 NCBI 平台上进行比对,以确定菌株的分类地位,并基于 16S rRNA 基因序列对鉴定出的菌株进行初步命名。

1.9 三种微生物的 RT-qPCR 验证分析

基于 16S rRNA 基因全长扩增子测序结果,肠杆菌属(*Enterobacter*)、沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)和杀雄菌属(*Arsenophonus*)分别在 SL 组、YC 组和 WF 组中相对丰度最高。为验证其在烟草甲幼虫肠道内的实际丰度,本研究选取这 3 种微生物的序列信息,使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物进行 RT-qPCR 相对定量分析。*Enterobacter* 引物序列为 F (5'-GAAGGATAGGGTCCGGTTCG-3')和 R (5'-TGATGCAACTAAGGATGAGGG-3')。*Wolbachia* 引物序列为 F (5'-TTAGCGACAGAAGAAGCACC G-3')和 R (5'-TTGAATGCCATTCCCAGGTT-3')。*Arsenophonus* 引物序列为 F (5'-GGTGTAGCGG TGAAATGCGTAG-3')和 R (5'-TCAAGGGCAC AACCTCCAAG-3')。选取烟草甲 LSRPL18 作为内参基因^[26],采用 SYBR Green 染料法进行相对定量分析。操作步骤和反应体系严格遵循 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书。反应体系(20 μL): 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , 上游引物

(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , DNA 模板(10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。反应条件采用两步法: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 熔解曲线 65–95 $^{\circ}\text{C}$, 每次增加 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 持续 5 s; 读板检测。反应结束后, 分析扩增曲线和熔解曲线。以对照组样品的相对表达量设定为 1.0, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 法计算目的基因的相对丰度。数据以平均值 \pm 标准误表示。利用 GraphPad Prism8 软件进行数据绘图和统计分析。组内差异以平均值 \pm 标准误表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验 3 组间基因相对丰度的显著性差异。此外, 为比较同种细菌基因在不同食料组(SL, YC, WF)间的最高相对丰度值, 进行两两 t 检验。 $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 烟草甲幼虫肠道菌群分类注释与评估

对 3 组烟草甲幼虫肠道样本进行 16S rRNA 基因全长扩增子测序。SL 组(人工饲料, 6 个重复): 原始序列总量为 209 330 条; 经质量过滤和拼接后获得有效序列 204 945 条, 有效序列占比 97.91%。YC 组(烟草驯化, 6 个重复): 原始序列总量为 235 670 条; 获得有效序列 233 978 条, 有效序列占比 99.28%。WF 组(野生环境, 3 个重复): 原始序列总量为 112 708 条; 获得有效序列 111 950 条, 有效序列占比 99.33%。基于 97% 相似度阈值对优化后的有效序列进行聚类分析(表 1)。SL 组共鉴定出 174 个 OTUs, 注释细菌涵盖 6 门 10 纲 16 目 24 科 46 属 73 种。YC 组共鉴定出 115 个 OTUs, 注释细菌涵盖 8 门 12 纲 18 目 26 科 43 属 60 种。WF 组共鉴定出 62 个 OTUs, 注释细菌涵盖 6 门 10 纲 13 目 17 科 30 属 40 种。

2.2 烟草甲幼虫肠道 OTU 水平韦恩图分析

SL 组、YC 组和 WF 组中烟草甲幼虫肠道的 OTUs 分布情况如图 1 所示。其中, SL 组幼

虫肠道共检测到 174 个 OTUs, YC 组为 115 个 OTUs, WF 组则为 62 个 OTUs。另外, 3 组样本共同的 OTUs 数量为 44 个。在共有菌占比方面, SL 组为 25.29%, YC 组为 38.26%, WF 组

表 1 不同饲料烟草甲幼虫肠道细菌 OTU 聚类及各分类地位数量

Table 1 Clustering of OTUs of intestinal bacteria in different feed *Lasioderma serricorne* larvae and the quantity of each taxonomic status

| Item | SL | YC | WF | Total |
|---------|-----|-----|----|-------|
| OTUs | 174 | 115 | 62 | 196 |
| Phylum | 6 | 8 | 6 | 8 |
| Class | 10 | 12 | 10 | 13 |
| Order | 16 | 18 | 13 | 20 |
| Family | 24 | 26 | 17 | 30 |
| Genus | 46 | 43 | 30 | 52 |
| Species | 73 | 60 | 40 | 80 |

SL: 人工饲料组; YC: 烟草驯化组; WF: 野生驯化组。
SL: Artificial feed group; YC: Tobacco domestication group; WF: Wild environment group.

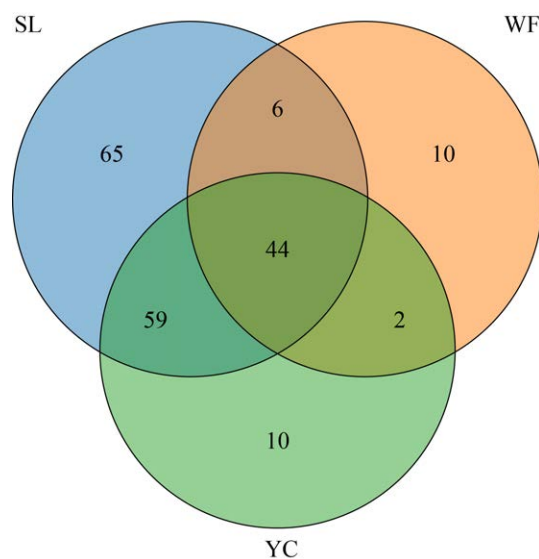


图 1 不同食料烟草甲幼虫肠道细菌的韦恩图
SL: 人工饲料组; YC: 烟草驯化组; WF: 野生驯化组。

Figure 1 Venn diagram of different feed *Lasioderma serricorne* larvae gut bacteria. SL: Artificial feed group; YC: Tobacco domestication group; WF: Wild environment group.

高达 70.97%。综合来看, SL 组烟草甲幼虫肠道的微生物多样性最为丰富, YC 组次之, 而 WF 组的微生物多样性则相对较低, 这一现象与食物的复杂程度紧密相关。在各样本中, 存在一些稳定存在的细菌, 它们可能构成了肠道的常驻菌群, 即便幼虫取食不同食物, 这些细菌仍能保持稳定。与此同时, 一些非常驻菌群在样本间表现出显著差异, 其组成会随昆虫取食的食物及肠道环境因素的变化而发生改变。

2.3 α 多样性分析

Sobs 指数、Chao1 指数和 ACE 指数来评估不同食料环境下烟草甲幼虫肠道细菌 OTU 的丰富度时, 我们发现这些指数值越高意味着细菌群落的丰富度越高(图 2A-2C)。从各项指数的

具体数据来看, SL 组烟草甲幼虫的 Sobs 指数(图 2A)、Chao1 指数(图 2B)及 ACE 指数(图 2C)均明显高于 YC 组和 WF 组。由此可以得出, SL 组烟草甲幼虫肠道细菌的群落丰富度显著高于 YC 组和 WF 组。Shannon 指数和 Simpson 指数则主要用于反映细菌群落的多样性和均匀度。分析结果显示(图 2D-2F), 在 3 种不同食料环境下, 烟草甲幼虫肠道细菌的 Shannon 指数和 Simpson 指数均存在显著性差异, 这充分表明各组细菌群落的多样性和均匀度有着明显区别。综合细菌 α 多样性指数的各项结果, 我们进一步确认, SL 组烟草甲幼虫肠道细菌群落的丰富度显著高于 YC 组和 WF 组。这一结果表明, YC 组和 WF 组样品中优势菌群占比较高, 但整体细菌

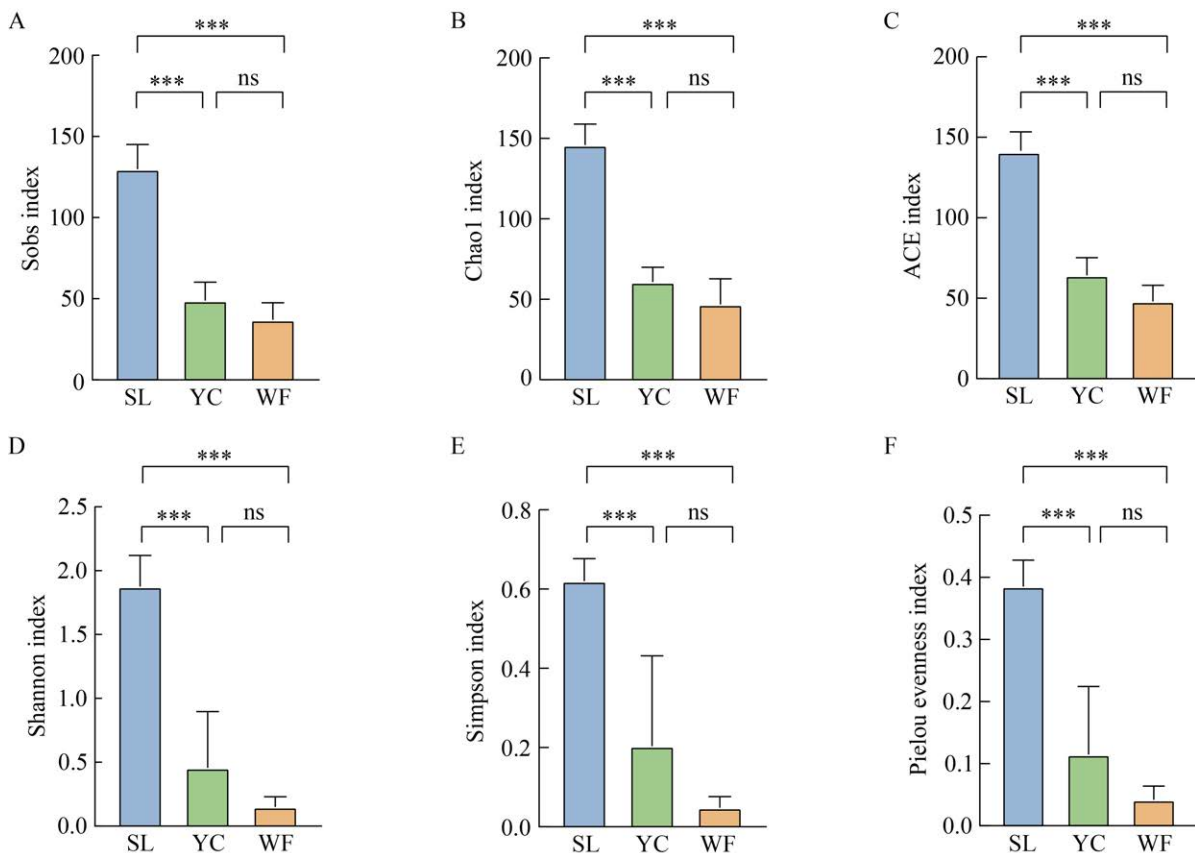


图 2 烟草甲幼虫的 α 多样性指数组间差异柱状图水平 A: Sobs 指数; B: Chao1 指数; C: ACE 指数; D: Shannon 指数; E: Simpson 指数; F: Pielou evenness 指数。

Figure 2 Alpha diversity of different feed *Lasioderma serricorne* larvae gut bacteria. A: Sobs index; B: Chao1 index; C: ACE index; D: Shannon index; E: Simpson index; F: Pielou evenness index. ***: $P < 0.001$; ns: $P \geq 0.05$.

种类相对匮乏。相比之下,SL组烟草甲幼虫肠道的细菌群落展现出了较高的物种丰富度。这些发现有力地证明了食料对烟草甲体内细菌群落具有显著影响,3种不同饲料处理下的细菌群落在多样性和均匀度方面均存在显著性差异。

2.4 β 多样性分析

分析结果表明,SL组、YC组及WF组的样品在分布上呈现出明显的区分态势,这充分说明3组烟草甲幼虫肠道的细菌组成与结构存在显著差异。为进一步检验这3组群落结构的差异性,

我们采用了ANOSIM分析,结果显示 R 值为1,有力地证实了3组烟草甲幼虫的微生物组之间存在显著差异。WF组的3个样品间距离最小,表明该组样品的微生物群落一致性最高,组内差异最小(图3A)。基于Binary Jaccard距离矩阵绘制的可视化箱型图显示,组间差异明显大于组内差异,这进一步表明在3种不同食料环境下, β 多样性存在显著差异(图3B)。根据UPGMA聚类结果(图3C),SL组的烟草甲样品被聚为一组,WF组的样品则聚为另一类。YC组的样品形成

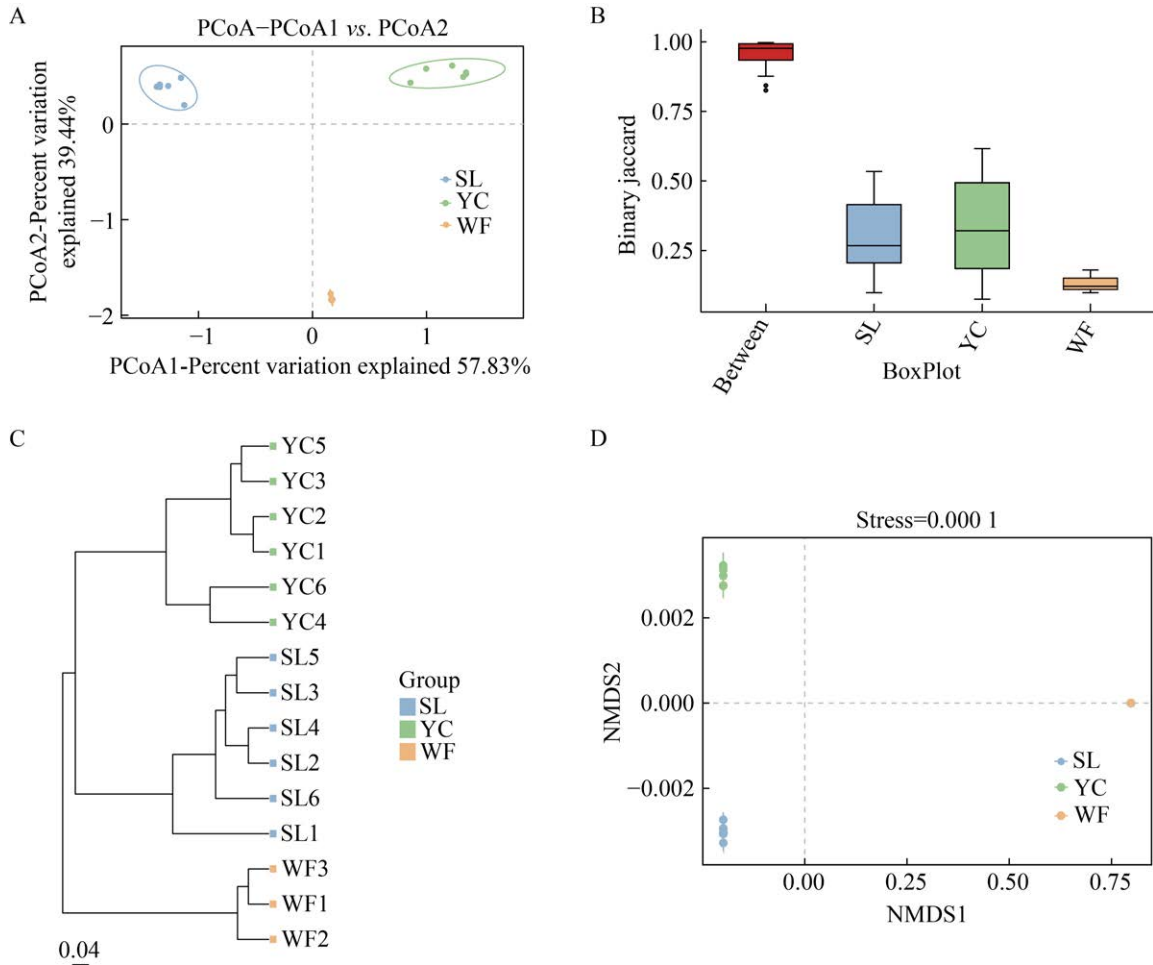


图3 烟草甲幼虫的细菌 β 多样性分析 A: 主坐标分析; B: 距离矩阵可视化箱线图; C: 样品非加权组平均法聚类树; D: 非度量多维尺度分析图。SL: 人工饲料组; YC: 烟草驯化组; WF: 野生环境组。

Figure 3 Beta diversity analysis of bacteria in *Lasioderma serricorne* larvae. A: Principal coordinates analysis (PCoA); B: Visualization boxplot of the distance matrix; C: Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering tree of samples; D: Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) analysis graph. SL: Artificial feed group; YC: Tobacco domestication group; WF: Wild environment group.

了第 3 类。样品可清晰地划分为 3 个不同的类群，这也反映出 3 组样品内的细菌群落存在显著差异。通常认为，当 NMDS 的 stress 值小于 0.2 时，数据具有较高的可靠性。而在本研究中，NMDS 的 stress 值为 0.000 1，这表明研究数据具有较高的可靠性(图 3D)。

2.5 烟草甲幼虫细菌物种多样性分析

在 196 个 OTUs 中，有 3 个(OTU1、OTU2、OTU3)被确定为优势富集 OTU，它们在整个数据集 OTU 总数中的占比高达 82.37%。其中，OTU1

为 *Wolbachia*，OTU2 为 *Arsenophonus*，OTU3 则为 *Enterobacter*。从细菌注释情况来看，在 SL 组中，烟草甲幼虫肠道注释出的细菌涵盖了 6 门 10 纲 16 目 24 科 46 属 73 种；YC 组中，细菌则包括 8 门 12 纲 18 目 26 科 43 属 60 种；而在 WF 组中，注释的细菌包含 6 门 10 纲 13 目 17 科 30 属 40 种。总体而言，烟草甲幼虫肠道的细菌群落以厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为主(图 4)。具体到各组，在 SL 组中，最丰富的 2 个细菌门是厚壁菌门(占比

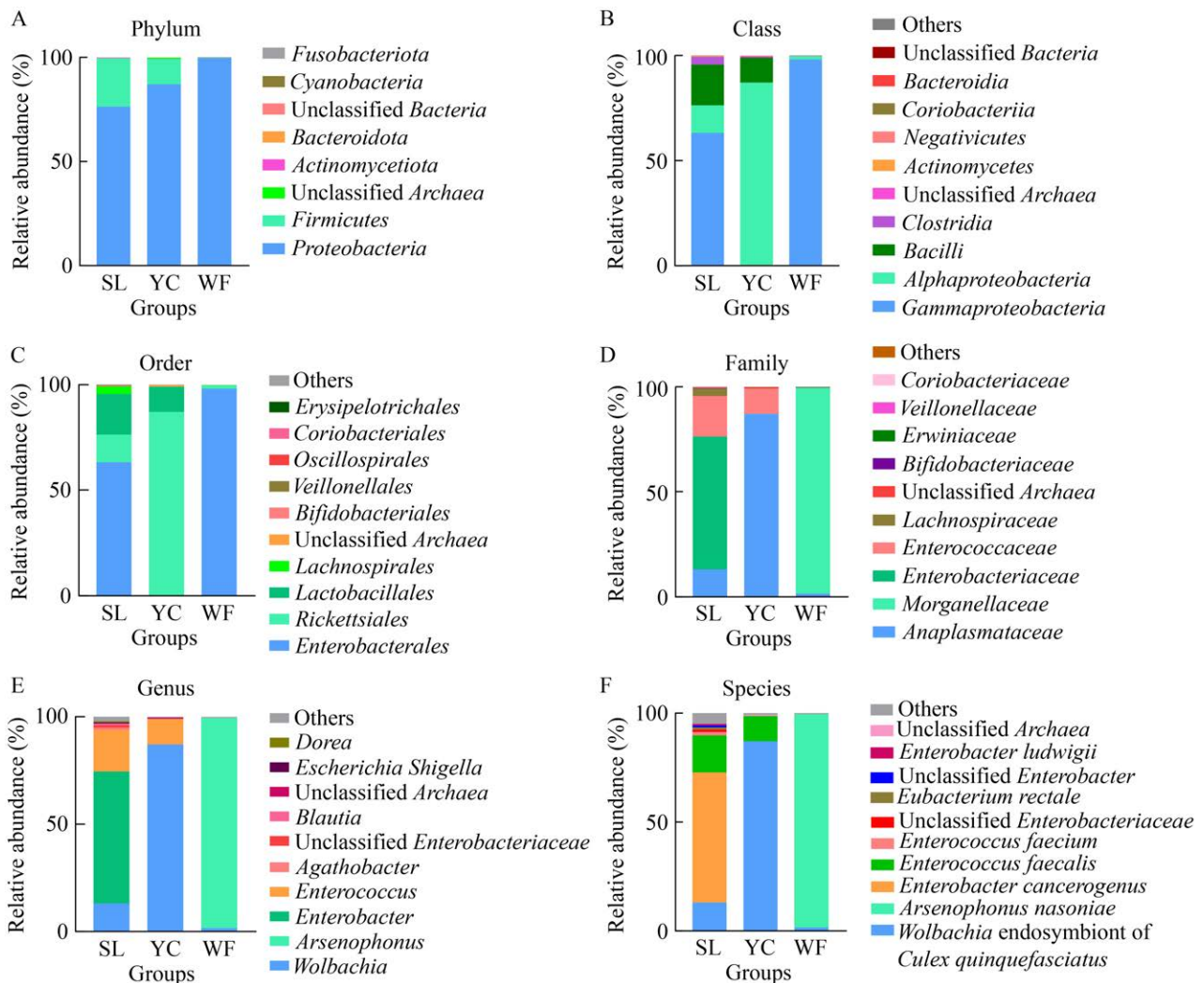


图 4 不同食料烟草甲幼虫体内细菌群落组成 A: 门水平; B: 纲水平; C: 目水平; D: 科水平; E: 属水平; F: 种水平上。

Figure 4 Composition of gut bacterial communities in *Lasioderma serricorne* larvae feeding on different diets. A: Phylum level; B: Class level; C: Order level; D: Family level; E: Genus level; F: Species level.

23.23%)和变形菌门(占比 76.34%),二者合计占比达到 99.57% (图 4A)。此外,SL 组中还存在放线菌门(*Actinomycetota*),不过其丰度相对较低。在 YC 组中,变形菌门的比例约为 87.13%。该组中其他丰度较低且已确认的门包括拟杆菌门(*Bacteroidota*)、梭杆菌门(*Fusobacteriota*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)和放线菌门(*Actinomycetota*)。在 WF 组中,变形菌门的占比为 99.73%。相较于 SL 组和 YC 组,WF 组的微生物组成呈现出更单一的群落结构。由此可见,食物的差异是导致肠道微生物核心群落出现差异的重要因素。

在门分类水平上,丰度前 8 的微生物主要包括变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、未分类的古细菌门(*unclassified Archaea*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、未分类细菌门(*unclassified Bacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)以及梭杆菌门(*Fusobacteriota*)。SL 组、YC 组和 WF 组这 3 组烟草甲幼虫的肠道菌群均包含变形菌门、厚壁菌门、未分类的古菌门、放线菌门及拟杆菌门,不过,它们在组成和相对丰度方面存在显著差异。在 3 组烟草甲幼虫的肠道菌群中,变形菌门均占据着第 1 优势种群的地位。其中,WF 组肠道菌群中变形菌门的含量最高,达到了 99.73%;SL 组和 YC 组肠道菌群中变形菌门的含量分别为 76.34%和 87.13%。厚壁菌门在 3 组中均为第 2 优势种群。SL 组肠道菌群中厚壁菌门的含量(23.23%)显著高于 YC 组(12.07%)和 WF 组(0.16%)。其他菌门种类的丰度相对较低,但 3 组烟草甲幼虫之间仍存在一定差异。另外,YC 组幼虫肠道中含有少量未分类的细菌门(0.05%),而在 SL 组和 WF 组幼虫肠道中未检测到该菌门。此外,少量蓝细菌门存在于 YC 组(0.03%)和 WF 组(0.000 9%)中,而在 SL 组中则未检测到。少量梭杆菌门存在于 YC 组(0.001%)和 SL 组(0.005%)中,WF 组中未检测到(表 2)。

在烟草甲幼虫肠道微生物纲水平物种丰度排名中,位居前 10 的依次为 γ -变形菌

表 2 三种食料下烟草甲幼虫肠道内门级物种丰度
Table 2 The species abundance at the phylum level in the intestines of three distinct groups of *Lasioderma serricorne* larvae

| Phylum | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|------------------------------|--------|--------|----------|
| <i>Proteobacteria</i> | 76.340 | 87.130 | 99.730 0 |
| <i>Firmicutes</i> | 23.230 | 12.070 | 0.160 0 |
| Unclassified <i>Archaea</i> | 0.030 | 0.600 | 0.006 0 |
| <i>Actinomycetota</i> | 0.390 | 0.050 | 0.100 0 |
| <i>Bacteroidota</i> | 0.007 | 0.060 | 0.000 9 |
| Unclassified <i>Bacteria</i> | 0 | 0.050 | 0 |
| <i>Cyanobacteria</i> | 0 | 0.030 | 0.000 9 |
| <i>Fusobacteriota</i> | 0.005 | 0.001 | 0 |

纲(*Gammaproteobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、梭菌纲(*Clostridia*)、未分类古细菌纲(*unclassified Archaea*)、放线菌纲(*Actinomycetes*)、阴性球菌纲(*Negativicutes*)、红螬菌纲(*Coriobacteriia*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)及未分类细菌纲(*unclassified Bacteria*) (图 4B)。就不同组别的情况而言,在 WF 组中,烟草甲幼虫肠道内的 γ -变形菌纲含量最高,占比达 98.11%,这一比例显著高于 SL 组的 63.18%。而在 YC 组中,仅检测到微量 γ -变形菌纲,其丰度仅为 0.03%。此外, α -变形菌纲在不同组别中的含量差异也较为明显。在 YC 组中,烟草甲幼虫肠道内 α -变形菌纲的含量最高,达到 87.09%;相比之下,SL 组和 WF 组中 α -变形菌纲的含量分别仅为 13.12%和 1.62%。芽孢杆菌纲在 SL 组、YC 组和 WF 组烟草甲幼虫肠道中的相对含量分别为 19.420%、11.890%、0.008%,其中 WF 组的芽孢杆菌纲含量明显低于其他两组。梭菌纲在 3 组中的占比分别为:SL 组 3.64%、YC 组 0.17%、WF 组 0.14%,其中 YC 组和 WF 组的含量较为接近。未分类古细菌纲、放线菌纲、阴性球菌纲、红螬菌纲和拟杆菌纲的相对含量具体如下:SL 组分别为 0.03%、0.28%、0.17%、0.11%、0.007%;YC 组分别为 0.60%、0.05%、0.01%、0.006%、0.06%;WF 组分别为 0.006%、0.09%、0.02%、0.009%、0.000 9%,未分

类细菌纲仅在 YC 组检测到,含量约为 0.05% (表 3)。

在 SL 组、YC 组和 WF 组的烟草甲幼虫肠道中,目水平丰度前 10 的种群包括肠杆菌目 (*Enterobacteriales*) (图 4C)。在这 3 组幼虫肠道内,肠杆菌目菌群的占比存在显著差异,分别为 63.68%、0.03%和 98.11%。其中,WF 组中的肠杆菌目占比显著高于 SL 组和 YC 组。立克次氏体目(*Rickettsiales*)在这 3 组幼虫肠道的占比分别为 13.12%、87.09%、1.62%; YC 组在该目菌群的占比明显高于其他两组。乳杆菌目 (*Lactobacillales*)在 SL 组、YC 组和 WF 组烟草甲幼虫肠道中的占比分别为 19.35%、11.89%、0.006%。毛螺菌目(*Lachnospirales*)、未分类古细菌目 (*unclassified Archaea*)、双歧杆菌目 (*Bifidobacteriales*)、韦荣氏球菌目(*Veillonellales*)、颤螺菌目(*Oscillospirales*)、红螬菌目(*Coriobacteriale*)和丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)在各组烟草甲幼虫肠道中的占比情况如下:在 SL 组中,占比分别为 3.55%、0.03%、0.28%、0.17%、0.09%、0.11%、0.07%;在 YC 组中,占比分别为 0.14%、0.60%、0.05%、0.01%、0.03%、0.006%、0.002%;在 WF 组中,占比分别为 0.12%、0.006%、0.09%、0.02%、0.01%、0.009%、0.002% (表 4)。

表 3 三种饲料下烟草甲幼虫肠道内纲水平物种丰度

Table 3 The species abundance at the class level in the intestines of three distinct groups of *Lasioderma serricorne* larvae

| Class | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|------------------------------|--------|--------|----------|
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 63.180 | 0.030 | 98.110 0 |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 13.120 | 87.090 | 1.620 0 |
| <i>Bacilli</i> | 19.420 | 11.890 | 0.008 0 |
| <i>Clostridia</i> | 3.640 | 0.170 | 0.140 0 |
| <i>Unclassified Archaea</i> | 0.030 | 0.600 | 0.006 0 |
| <i>Actinomycetes</i> | 0.280 | 0.050 | 0.090 0 |
| <i>Negativicutes</i> | 0.170 | 0.010 | 0.020 0 |
| <i>Coriobacteriia</i> | 0.110 | 0.006 | 0.009 0 |
| <i>Bacteroidia</i> | 0.007 | 0.060 | 0.000 9 |
| <i>Unclassified Bacteria</i> | 0 | 0.050 | 0 |
| Others | 0.050 | 0.030 | 0.000 9 |

表 4 三种饲料下烟草甲幼虫肠道内目水平物种丰度

Table 4 The species abundance at the order level in the intestines of three distinct groups of *Lasioderma serricorne* larvae

| Order | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Enterobacteriales</i> | 63.18 | 0.030 | 98.110 |
| <i>Rickettsiales</i> | 13.12 | 87.090 | 1.620 |
| <i>Lactobacillales</i> | 19.35 | 11.890 | 0.006 |
| <i>Lachnospirales</i> | 3.55 | 0.140 | 0.120 |
| <i>Unclassified Archaea</i> | 0.03 | 0.600 | 0.006 |
| <i>Bifidobacteriales</i> | 0.28 | 0.050 | 0.090 |
| <i>Veillonellales</i> | 0.17 | 0.010 | 0.020 |
| <i>Oscillospirales</i> | 0.09 | 0.030 | 0.010 |
| <i>Coriobacteriales</i> | 0.11 | 0.006 | 0.009 |
| <i>Erysipelotrichales</i> | 0.07 | 0.002 | 0.002 |
| Others | 0.06 | 0.150 | 0.004 |

在 SL 组、YC 组和 WF 组的烟草甲幼虫肠道中,在科水平上含量位居前 10 的微生物种类里,无浆体科(*Anaplasmataceae*)在 YC 组的占比高达 87.09%,这一比例远超 SL 组的 13.12%和 WF 组的 1.62% (图 4D)。摩根氏菌科(*Morganellaceae*) 在 WF 组中的占比极为突出,达到 97.91%,显著高于 YC 组的 0.000 9%,并且在 SL 组中未检测到该科微生物。肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*) 在 SL 组烟草甲幼虫肠道的含量最高,为 63.17%。而在 YC 组和 WF 组中,肠杆菌科的含量较为接近,分别为 0.03%和 0.02%;肠球菌科 (*Enterococcaceae*)和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*) 在 SL 组中的占比分别为 19.34%和 3.55%,均显著高于 YC 组的 11.88%和 0.14%,以及 WF 组的 0.000 8%和 0.12%。未分类古细菌科(*unclassified Archaea*)在 YC 组中的占比为 0.60%,显著高于 SL 组的 0.03%和 WF 组 0.006%;双歧杆菌科 (*Bifidobacteriaceae*)、韦荣氏球菌科(*Veillonellaceae*)、红螬菌科(*Coriobacteriaceae*)在 SL 组的占比分别为 0.28%、0.15%、0.10%,均高于 YC 组的 0.05%、0.000 9%、0.006%以及 WF 组的 0.09%、0、0.009%,另外,在 WF 组中未检测到韦荣氏球菌科的存在。欧文氏菌科(*Erwiniaceae*)在 WF

组的含量最高为 0.18%，显著高于 SL 组的 0.005%和 WF 组的 0.000 9%。总体而言，这 3 组烟草甲幼虫肠道中的优势微生物种群各不相同，并且在丰度方面也存在较大差异(表 5)。

在 SL 组、YC 组和 WF 组中，烟草甲幼虫肠道丰度属水平排名前 10 的微生物具体如下(图 4E): *Wolbachia* 在 YC 组的含量高达 87.09%，这一比例显著高于 SL 组的 13.12%和 WF 组的 1.62%；*Arsenophonus* 在 WF 组的含量显著高于 YC 组的 0.000 9%，而 SL 组未检测到 *Arsenophonus* 的存在；*Enterobacter* 在 SL 组中的占比为 61.43%，在 YC 组中仅占 0.02%，WF 组中未检测到肠杆菌属；肠球菌属(*Enterococcus*) 在 SL 组中占比为 19.34%，明显高于 YC 组的 11.88%和 WF 组的 0.000 8%；有益杆状菌属(*Agathobacter*) 在 SL 组的占比为 1.06%，在 YC 组占比为 0.01%，在 WF 组中占比为 0.02%；未分类的肠杆菌科(*Unclassified Enterobacteriaceae*) 在 SL 组和 YC 组中均有少量存在，占比分别为 1.08%和 0.000 4%；与肠杆菌属相似，*unclassified Enterobacteriaceae* 在 WF 组中未被检测到；布劳特氏菌属(*Blautia*)、*unclassified Archaea*、大肠杆菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*) 和 多尔氏菌属(*Dorea*) 在 SL 组中的占比分别为

表 5 三种饲料下烟草甲幼虫肠道内科水平物种丰度肠道

Table 5 The species abundance at the family level in the intestines of three distinct groups of *Lasioderma serricorne* larvae

| Family | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|-----------------------------|--------|----------|----------|
| <i>Anaplasmataceae</i> | 13.120 | 87.090 0 | 1.620 0 |
| <i>Morganellaceae</i> | 0 | 0.000 9 | 97.910 0 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 63.170 | 0.030 0 | 0.020 0 |
| <i>Enterococcaceae</i> | 19.340 | 11.880 0 | 0.000 8 |
| <i>Lachnospiraceae</i> | 3.550 | 0.140 0 | 0.120 0 |
| Unclassified <i>Archaea</i> | 0.030 | 0.600 0 | 0.006 0 |
| <i>Bifidobacteriaceae</i> | 0.280 | 0.050 0 | 0.090 0 |
| <i>Erwiniaceae</i> | 0.005 | 0.000 9 | 0.180 0 |
| <i>Veillonellaceae</i> | 0.150 | 0.000 9 | 0 |
| <i>Coriobacteriaceae</i> | 0.100 | 0.0060 0 | 0.009 0 |
| Others | 0.25 | 0.20 | 0.04 |

0.79%、0.03%、0.55%、0.49%，在 YC 组中的占比分别为 0.05%、0.60%、0.01%、0.01%，在 WF 组中的占比分别为 0.04%、0.006%、0.02%、0.009% (表 6)。

在烟草甲幼虫肠道内，10 种主要细菌于种水平上的丰度在 SL 组、YC 组和 WF 组之间呈现出显著差异(图 4F)。具体而言，*Wolbachia endosymbiont of Culex quinquefasciatus* 在 3 组中的占比分别为：SL 组 13.07%，YC 组 87.09%，WF 组 1.62%。飞虫杀雄菌(*Arsenophonus nasoniae*) 在 3 组中的占比情况差异明显：SL 组未检出，YC 组占比 0.000 9%，WF 组占比高达 97.88%。生癌肠杆菌(*Enterobacter cancerogenus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、*unclassified Enterobacteriaceae*、*unclassified Enterobacter* 及路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) 这 6 种细菌在 SL 组中的占比依次为：59.69%、16.99%、1.59%、1.08%、0.88%、0.69%；而在 YC 组中，它们的占比分别为：0.02%、11.57%、0.002%、0.000 4%、0.001%、0.001%；另外，在 WF 组中，这 6 种细菌均未被检测到。此外，直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*) 和未分类的古细菌(*unclassified Archaea*) 在 3 组中的占比

表 6 三种饲料下烟草甲幼虫肠道内属水平物种丰度

Table 6 The species abundance at the genus level in the intestines of three distinct groups in *Lasioderma serricorne* larvae

| Genus | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|-----------------------------|--------|----------|----------|
| <i>Wolbachia</i> | 13.12 | 87.090 0 | 1.620 0 |
| <i>Arsenophonus</i> | 0.00 | 0.000 9 | 97.910 0 |
| <i>Enterobacter</i> | 61.43 | 0.020 0 | 0 |
| <i>Enterococcus</i> | 19.34 | 11.880 0 | 0.000 8 |
| <i>Agathobacter</i> | 1.06 | 0.010 0 | 0.020 0 |
| Unclassified | 1.08 | 0.000 4 | 0 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | | | |
| <i>Blautia</i> | 0.79 | 0.050 0 | 0.040 0 |
| Unclassified <i>Archaea</i> | 0.03 | 0.600 0 | 0.006 0 |
| <i>Escherichia-Shigella</i> | 0.55 | 0.010 0 | 0.020 0 |
| <i>Dorea</i> | 0.49 | 0.010 0 | 0.009 0 |
| Others | 2.10 | 0.320 0 | 0.370 0 |

各有不同：SL 组中，*E. rectale* 占比 1.02%，unclassified *Archaea* 占比 0.03%；在 YC 组中，*E. rectale* 占比降至 0.001%，而 unclassified *Archaea* 占比则升至 0.60%；在 WF 组中，*E. rectale* 占比为 0.02%，unclassified *Archaea* 占比为 0.006% (表 7)。

在 3 种不同食料条件下，各分类阶元中特有细菌类群的相对丰度存在显著差异(表 8)。具体而言，在门水平上，蓝细菌门(*Cyanobacteria*) 在 YC 组和 WF 组中的占比分别为 0.03%和 0.000 9%，而在 SL 组中未被检测到；梭杆菌门(*Fusobacteriota*)在 SL 组和 YC 组中的占比分别为 0.005%和 0.001%，在 WF 组中则未检出。在科水平上，摩根氏菌科(*Morganellaceae*)在 YC 组和 WF 组中的相对丰度分别为 0.000 9%和 97.91%，SL 组中未检测到；韦荣氏球菌科(*Veillonellaceae*)在 SL 组和 YC 组中的相对丰度分别为 0.15%和 0.000 9%，在 WF 组中未发现其踪迹。在属水平上，*Arsenophonus* 在 YC 组和 WF 组中的占比分别为 0.000 9%和 97.91%，SL 组中未检测到；*Enterobacter* 在 SL 组和 YC 组中的占比分别为 61.43%和 0.02%，在 WF 组中

未检测到；此外，unclassified *Enterobacteriaceae* 在 SL 组和 YC 组中的占比分别为 1.08%和 0.000 4%，在 WF 组中未检测到。在种水平上，*A. nasoniae* 在 YC 组和 WF 组中的相对丰度分别为 0.000 9%和 97.88%，在 SL 组中未检测到。*E. cancerogenus*、*E. faecalis*、*E. faecium*、unclassified *Enterobacter* 以及 *E. ludwigii* 在 SL 组相对丰度依次为 59.69%、16.99%、1.59%、0.88%、0.69%；在 YC 组相对丰度依次为 0.02%、11.57%、0.002%、0.01%、0.001%；在 WF 组均未检测到(表 8)。

Enterobacter、*Wolbachia* 及 *Arsenophonus* 是较为典型的菌属(图 5A–5C)。在 SL 组中，*Enterobacter* 的丰度高达 61.43%，在 YC 组样品里，*Wolbachia* 的丰度为 87.09%，而在 WF 组样品中，*Arsenophonus* 的丰度高达 97.91%。从菌属分类水平分析，3 组烟草甲幼虫肠道菌群的主要菌属分布状况及优势菌群所占比例均存在差异。具体而言，SL 组烟草甲幼虫肠道菌群的整体物种丰度明显高于 YC 组和 WF 组。SL 组、YC 组和 WF 组分别选择了不同的细菌群体，这使得每组的微生物群落呈现出独特的结构与功能特征。

表 7 三种饲料下烟草甲幼虫肠道内种水平物种丰度

Table 7 The species abundance at the species level in the intestines of three distinct groups in *Lasioderma serricornis* larvae

| Species | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|--|--------|----------|--------|
| <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Culex quinquefasciatus</i> | 13.07 | 87.090 0 | 1.620 |
| <i>Arsenophonus nasoniae</i> | 0 | 0.000 9 | 97.880 |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i> | 59.69 | 0.020 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 16.99 | 11.570 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 1.59 | 0.002 0 | 0 |
| Unclassified | 1.08 | 0.000 4 | 0 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | | | |
| <i>Eubacterium rectale</i> | 1.02 | 0.001 0 | 0.020 |
| Unclassified <i>Enterobacter</i> | 0.88 | 0.001 0 | 0 |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> | 0.69 | 0.001 0 | 0 |
| Unclassified <i>Archaea</i> | 0.03 | 0.600 0 | 0.006 |
| Others | 4.94 | 0.700 0 | 0.470 |

表 8 不同食料下的烟草甲幼虫肠道特有细菌
Table 8 Specific bacteria in the intestines of *Lasioderma serricornis* larvae under different food sources

| Bacterial taxonomy name | SL (%) | YC (%) | WF (%) |
|----------------------------------|--------|----------|----------|
| <i>Cyanobacteria</i> | 0 | 0.030 0 | 0.000 9 |
| <i>Fusobacteriota</i> | 0.005 | 0.001 0 | 0 |
| <i>Morganellaceae</i> | 0 | 0.000 9 | 97.910 0 |
| <i>Veillonellaceae</i> | 0.150 | 0.000 9 | 0 |
| <i>Arsenophonus</i> | 0 | 0.000 9 | 97.910 0 |
| <i>Enterobacter</i> | 61.430 | 0.020 0 | 0 |
| Unclassified | 1.080 | 0.000 4 | 0 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | | | |
| <i>Arsenophonus nasoniae</i> | 0 | 0.000 9 | 97.880 0 |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i> | 59.690 | 0.020 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 16.990 | 11.570 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 1.590 | 0.002 0 | 0 |
| Unclassified <i>Enterobacter</i> | 0.880 | 0.010 0 | 0 |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> | 0.690 | 0.001 0 | 0 |

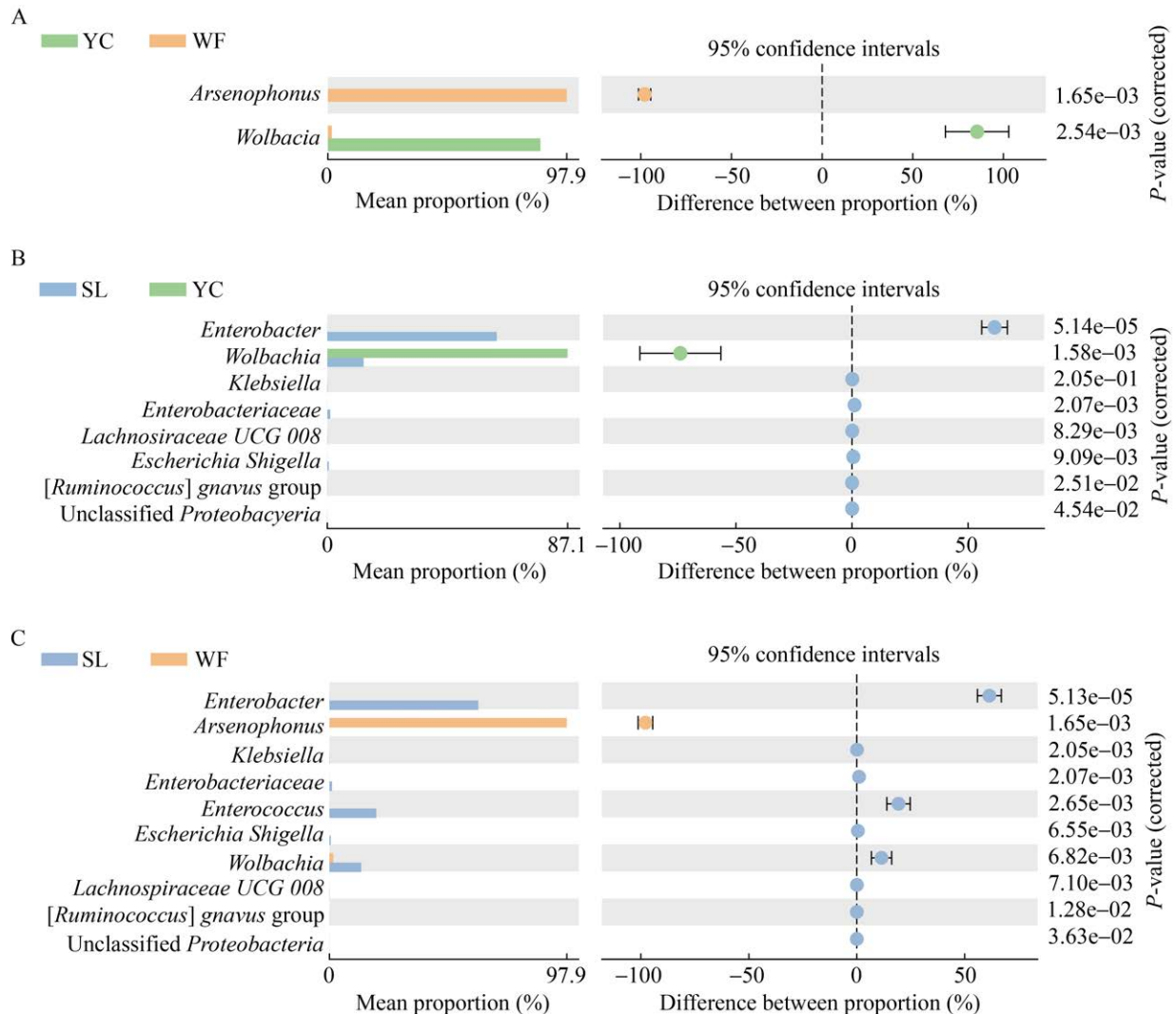


图5 三组菌群之间的显著差异

Figure 5 The significant differences among the three groups of microbial communities.

2.6 三种优势共生菌的表达量差异分析

针对 *Enterobacter*、*Wolbachia* 及 *Arsenophonus* 这 3 种优势共生菌，我们开展了定量检测工作。*Enterobacter* 在 SL 组内的表达量最高，YC 组次之，而 WF 组中的表达量最低(图 6A)；*Wolbachia* 在 YC 组内的表达量最高，SL 组次之，WF 组表达量最低(图 6B)；*Arsenophonus* 则在 WF 组中的表达量最高，在 YC 组和 SL 组内的表达量均较低(图 6C)。表 6 结果表明，*Enterobacter* 在 SL 组、YC 组、WF 组中的物种丰度分别为 61.43%、0.02%、0；

Wolbachia 在 SL 组、YC 组、WF 组中的物种丰度分别为 13.12%、87.09%、1.62%；*Arsenophonus* 在 SL 组、YC 组、WF 组中的物种丰度分别为 0、0.000 9%、97.91%。综合分析以上数据，我们发现 3 组烟草甲幼虫感染 *Wolbachia* 与 *Arsenophonus* 的数量与 16S rRNA 基因测序所呈现的 3 种食料条件下烟草甲幼虫肠道内物种丰度的结果基本一致。

2.7 烟草甲幼虫肠道细菌的分离

经由不同培养基筛选，我们得到了特定编号的菌株：利用纤维素筛选培养基筛选出的菌

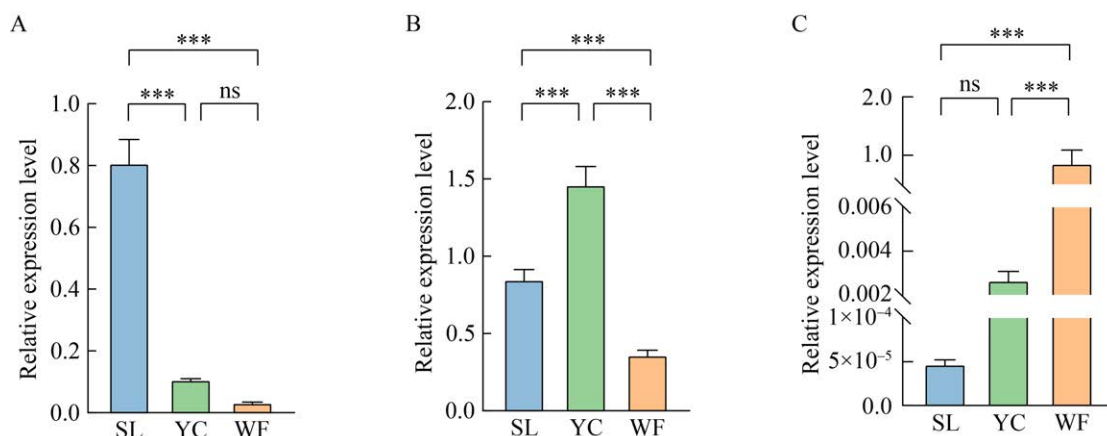


图 6 肠杆菌属(A)、沃尔巴克氏体属(B)与杀雄菌属(C)的相对表达水平
 Figure 6 Relative expression level of *Enterobacter* (A), *Wolbachia* (B) and *Arsenophonus* (C). ***: $P < 0.001$; ns: $P \geq 0.05$.

株编号为 SL1、YC5；借助 LB 培养基筛选出的菌株编号包括 SL6、SL5、YC3、WF6、SLL、YCL；通过 2.0 g/L 烟碱培养基筛选出的菌株编号为 YC1、WF2；采用 2.0 g/L 烟草浸出液培养基筛选出的菌株编号为 WF8、WF10、CB2。经过分离培养，最终共获取了 13 株菌(图 7)。

2.8 细菌鉴定结果

我们对分离得到的 13 株菌进行了显微镜观察，详细记录了它们的菌落形态特征。随后开展了革兰氏染色试验，进一步观察各株细菌的形态特征及染色反应(表 9)。借助 NCBI 序列比对分析(表 10)，发现这 13 株细菌可归为 5 个不同的属，分别是泛菌属(*Pantoea*) (SL1、YC5)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (SL6、YC1、WF2、WF8、WF10)、肠杆菌属(*Enterobacter*) (CB2)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*) (SL5、YC3)和肠球菌属(*Enterococcus*) (WF6、SLL、YCL)。通过在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对，选取与 16S rRNA 基因序列相似度较高的序列来构建系统发育树(图 8)。结合显微镜下观察到的形态特征，鉴定出各菌株的种属信息如下：菌株 YC1、WF2、SL6 被鉴定为抗辐射不动杆菌(*Acinetobacter radioresistens*)；菌株 WF8、WF10 被鉴定为土壤不动杆菌(*Acinetobacter soli*)；菌株 SL1

被鉴定为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)；菌株 YC5 被鉴定为分散泛菌(*Pantoea dispersa*)；菌株 CB2 被鉴定为生癌肠杆菌(*Enterobacter cancerogenus*)；菌株 YC3、SL5 被鉴定为印度微小杆菌(*Exiguobacterium indicum*)；菌株 SLL、YCL、WF6 被鉴定为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。

3 讨论

同一种昆虫取食不同食物时，其肠道微生物群落存在显著差异。研究表明，云斑天牛(*Batocera horsfieldi* Hope)^[27]的摄食习性会直接影响其肠道微生物群落的构成，不同食物来源携带的微生物群落不相同。Dillon 等^[28]的研究也表明，以不同饲料喂养的蝗虫(*Schistocerca gregaria* Forsk)，其肠道微生物在数量和种类上均存在较大差异。在割过的草地上饲养的蝗虫，其肠道微生物群落要比在温室小麦上饲养的蝗虫多 30 倍，且从这两种不同食料中分离出的可培养细菌数量相差 70 倍，菌落类型呈现出细菌多样性的巨大差异。以珠芽蓼(*Polygonum viviparum* Linn)块根为食的贡嘎蝠蛾(*Hepialus gonggaensis* Fu et Huang)幼虫肠道中，优势菌群为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)^[29]。而刘莉等^[30]在以胡萝卜

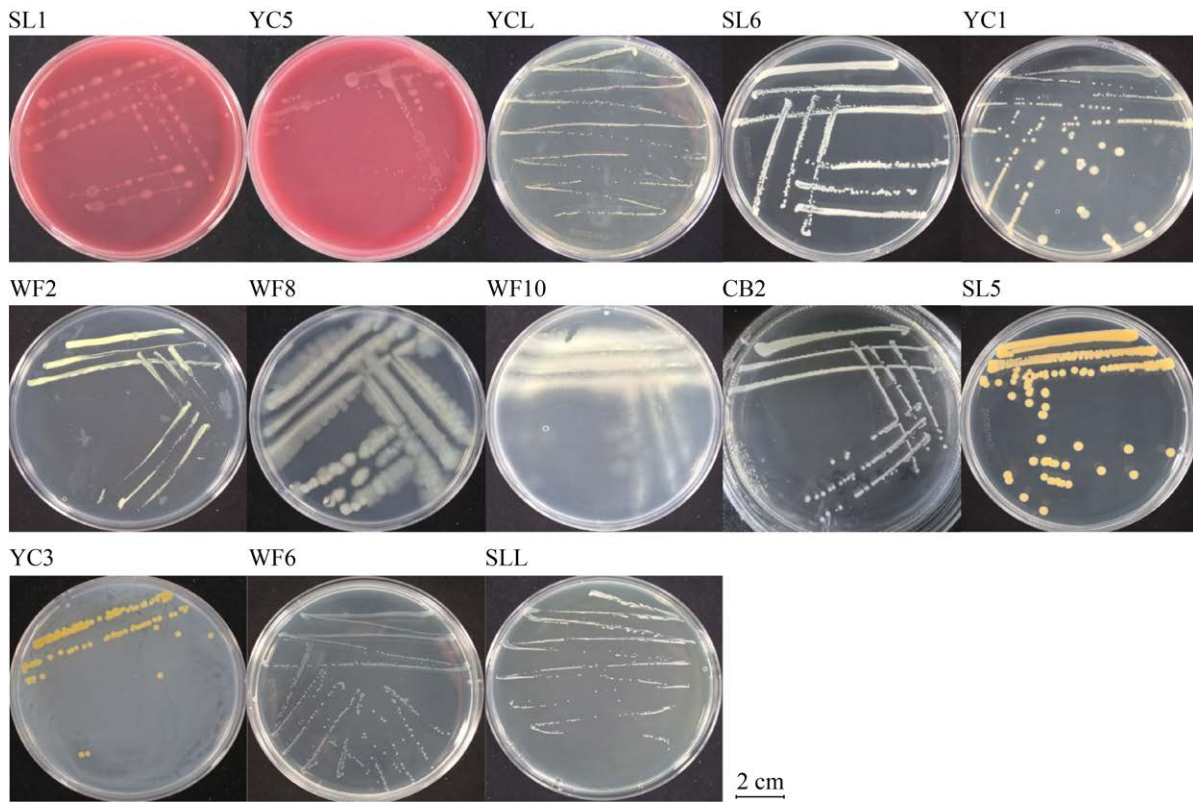


图7 烟草甲幼虫肠道细菌菌落

Figure 7 Bacteria strains from the gut of *Lasioderma serricorne* larvae.

表9 烟草甲幼虫肠道可培养细菌的形态特征及菌落特点

Table 9 Morphological characteristics and colony traits of intestinal symbiotic bacteria from *Lasioderma serricorne* larvae

| Strain code | Bacterium shape | Gram staining | Characteristics of colony | | | | | |
|-------------|-----------------|---------------|---------------------------|------------|--------------|----------------|--------------|-----------------|
| | | | Morphology | Glossiness | Edge feature | Uplifted state | Transparency | Color |
| SL1 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |
| YC5 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | Pale yellow |
| SL6 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |
| YC1 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |
| WF2 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | Pale yellow |
| WF8 | Rod-shaped | - | Irregular | Rough | Irregular | Flat | Opaque | Yellowish white |
| WF10 | Rod-shaped | - | Irregular | Rough | Irregular | Flat | Opaque | Yellowish white |
| CB2 | Rod-shaped | - | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | Pale yellow |
| SL5 | Rod-shaped | + | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | Yellow |
| YC3 | Rod-shaped | + | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | Yellow |
| WF6 | Orbicular | + | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |
| SLL | Orbicular | + | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |
| YCL | Orbicular | + | Circular | Smooth | Neat | Flat | Opaque | White |

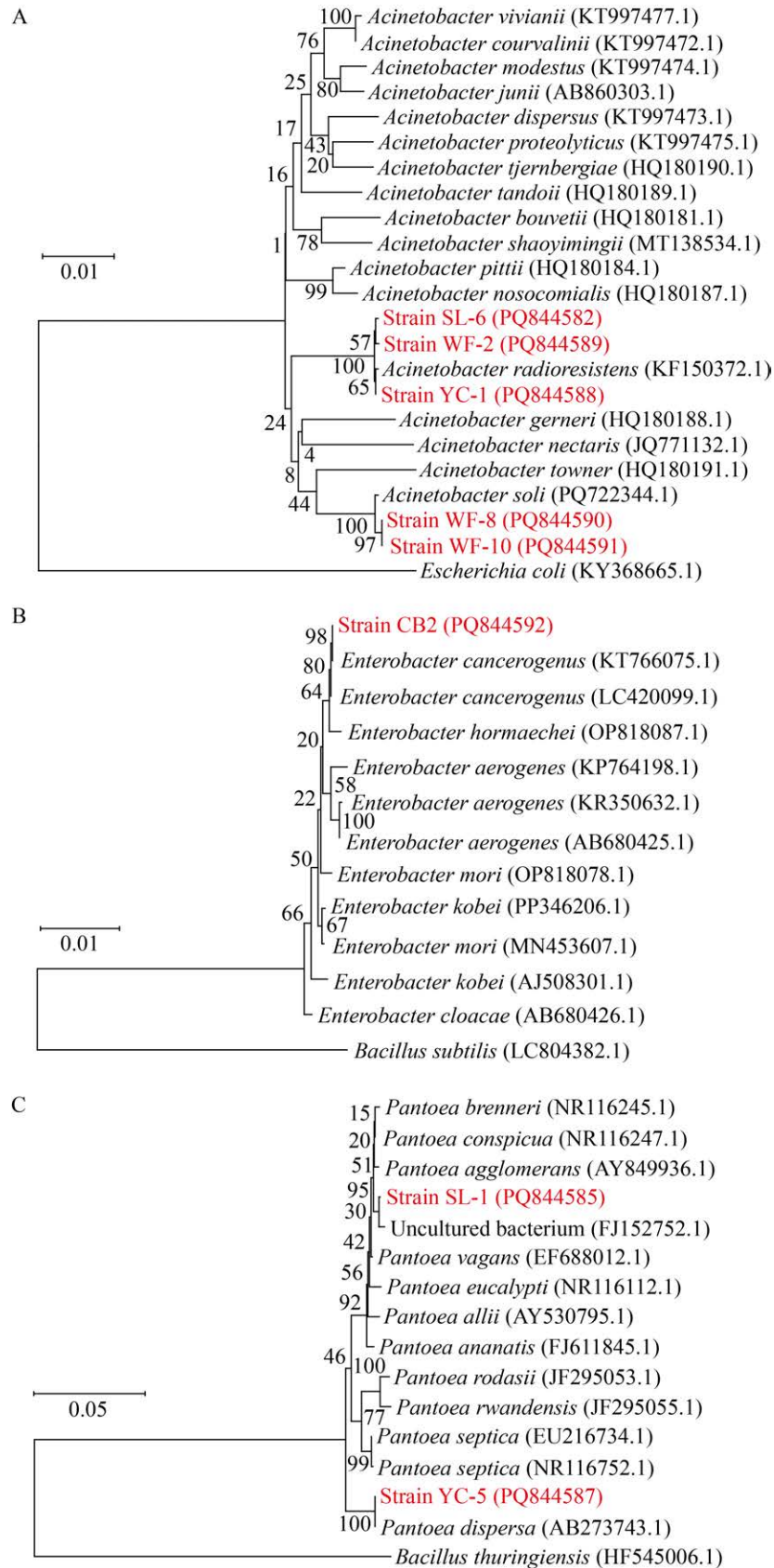
表 10 烟草甲幼虫肠道可培养细菌的 16S rRNA 基因序列比对分析

Table 10 The 16S rRNA gene sequence identification results for the culturable bacteria found *Lasioderma serricorne* larvae

| Phylum | Genus | Strain code | Similar species | Identity (%) | |
|---------------------|----------------------|------------------------|---|--|----|
| Firmicutes | <i>Acinetobacter</i> | SL6 | <i>Acinetobacter radioresistens</i> L64 | 100 | |
| | | YC1 | <i>Acinetobacter radioresistens</i> L64 | 100 | |
| | | WF2 | <i>Acinetobacter radioresistens</i> L64 | 99 | |
| | | WF8 | <i>Acinetobacter soli</i> HY24 | 100 | |
| | | WF10 | <i>Acinetobacter soli</i> HY24 | 100 | |
| | <i>Pantoea</i> | SL1 | <i>Pantoea agglomerans</i> EL107 | 99 | |
| | | YC5 | <i>Pantoea dispersa</i> S46 | 100 | |
| | <i>Enterobacter</i> | CB2 | <i>Enterobacter cancerogenus</i> TPY4 | 99 | |
| | Proteobacteria | <i>Exiguobacterium</i> | SL5 | <i>Exiguobacterium indicum</i> DSAM 62 | 99 |
| | | | YC3 | <i>Exiguobacterium indicum</i> DSAM 62 | 99 |
| <i>Enterococcus</i> | | WF6 | <i>Enterococcus faecalis</i> TC11 | 100 | |
| | | SLL | <i>Enterococcus faecalis</i> HBUR51044 | 100 | |
| | | YCL | <i>Enterococcus faecalis</i> HBUAS73292 | 100 | |

(*Daucus carota* Hoffm)和珠芽蓼根段为食料饲养下的贡嘎蝠蛾幼虫肠道中,发现优势菌群为肉食杆菌属(*Carnobacterium*)。此外,陈亚平等^[31]和张志红等^[32]从以玉米(*Zea mays* Linn)叶片为食的草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* J.E Smith)肠道中分离出变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)作为优势菌种。由此可见,不同食料对同一种昆虫肠道细菌结构具有显著影响。Srinivasan 等^[33]的报道指出,烟草甲的微生物群落会随饮食变化动态重组,其中 *Wolbachia* 占主导地位,平均占比为 83.8%,在以鹰嘴豆(*Cicer arietinum* Linn)为主的低营养饮食中,其丰度较低为 80%,转为高营养小麦(*Triticum aestivum* Linn)后显著增加 94%。这表明微生物群落在不同饮食条件下表现出显著的动态变化,尤其是在不同饮食源暴露和恢复的过程中,微生物群落会根据饮食源进行重组,显示出营养依赖的可塑性。本研究基于 PacBio SMRT 测序平台,采用 16S rRNA 基因全长扩增子测序技术,首次针对取食不同食料的烟草甲幼虫肠道细菌多样性进行了测序分析。结果显示,在 SL 组中,我们获取了 174 个 OTUs,注释出的细菌覆盖 6 门

10 纲 16 目 24 科 46 属 73 种, YC 组得到 115 个 OTUs,注释的细菌包含 8 门 12 纲 18 目 26 科 43 属 60 种。WF 组得到 62 个 OTUs,注释细菌覆盖 6 门 10 纲 13 目 17 科 30 属 40 种。从 OTUs 数据来看,烟草甲在 3 种食料下的 OTUs 数量存在显著差异,具体表现为 SL 组>YC 组>WF 组,这一结果与 Dillon 等^[28]的研究结论相吻合。进一步分析发现, *Enterobacter*、*Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 为最具代表性的属(图 5)。具体而言,SL 组中的 *Enterobacter* 丰度为 61.43%;在 YC 组中, *Wolbachia* 的丰度为 87.09%;在 WF 组中, *Arsenophonus* 的丰度达 97.91%。RT-qPCR 也进一步验证了 *Enterobacter*、*Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 这 3 种共生细菌在烟草甲中的相对表达量(图 6)。这表明随着食料的不同,烟草甲幼虫肠道中的优势菌群发生了显著变化,且 3 组烟草甲幼虫的不同优势菌之间的丰度差异显著。推测这种差异可能与不同食料的营养条件以及昆虫对不同食物的消化吸收能力密切相关。本研究的分析结果显示,不同的食料会显著影响烟草甲幼虫肠道菌群的丰度与结构,这一研究结果与 Srinivasan 等^[33]的报道相一致。



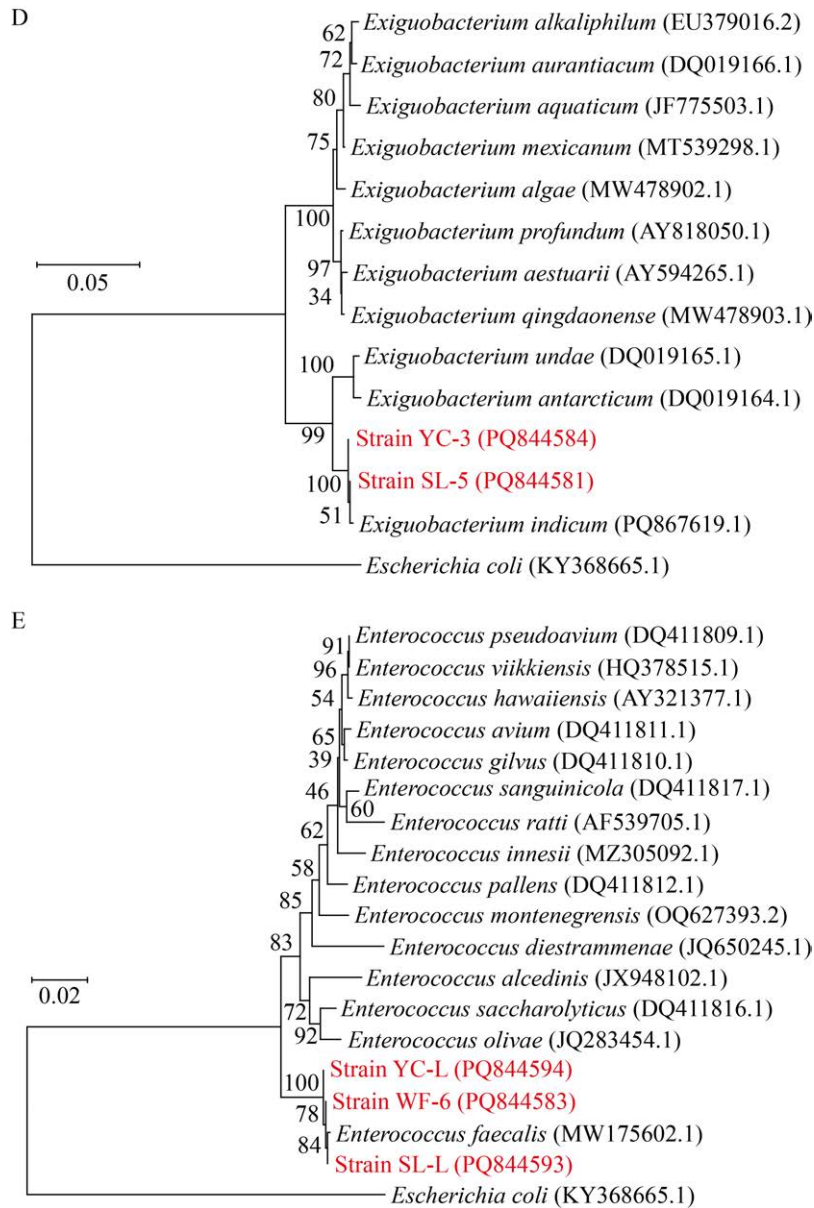


图 8 烟草甲肠道共生细菌的系统发育树 A: 不动杆菌属; B: 肠杆菌属; C: 泛菌属; D: 微小杆菌属; E: 肠球菌属。括号内序号为 GenBank 登录号; 0.01、0.02、0.05 为树的比例尺, 表示分支长度; 支点上方的数字为基于 1 000 次重复的 bootstrap 值。

Figure 8 Phylogenetic tree of the intestinal symbiotic bacteria associated with *Lasioderma serricorne*. A: *Acinetobacter*; B: *Enterobacter*; C: *Pantoea*; D: *Exiguobacterium*; E: *Enterococcus*. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The values 0.01, 0.02, and 0.05 correspond to the tree scales, denoting branch lengths; The values situated above the nodes are bootstrap values derived from 1 000 repetitions.

Enterobacter 属于变形菌门(*Proteobacteria*) 肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*), 是一种典型的革兰氏阴性细菌。肠杆菌科的大多数成员作为昆

虫的共生微生物, 在促进宿主肠道消化活动中发挥着重要作用^[34]。在茶尺蠖(*Ectropis obliqua* Hypulina)幼虫肠道分离出的细菌中, *Enterobacter*

占比高达 40.3%^[35]。Wang 等^[36]运用 16S rRNA 基因分析技术,从橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis* Hendel)幼虫肠道中分离出的优势菌群为 γ -变形菌纲肠杆菌科,其比例在 73.0%–98.3%之间。在本研究中,我们观察到烟草甲幼虫肠道内的 *Enterobacter* 在 SL 组样本中的比例显著高于其他两组,达 61.43%,在 YC 组中仅为 0.02%,而 WF 组中则未检测到 *Enterobacter* 的存在(表 6)。更为关键的是,在离体培养实验中,从 SL 组烟草甲幼虫肠道中分离出的 *Enterobacter* 占据优势地位。这一研究结果与前人的发现高度契合。

Wolbachia 属于变形菌门,是自然界广泛分布的一类细菌。据估计,近 50%–70%的昆虫都感染了 *Wolbachia*^[33]。最早, Sinkins 等^[37]在尖音库蚊(*Culex pipiens* Quinque)体内发现了 *Wolbachia*, 研究发现感染 *Wolbachia* 的雌性昆虫具有繁殖优势,这种优势使得 *Wolbachia* 能够在未感染的种群中迅速传播。黑腹果蝇(*Drosophila radicum* Meigen)^[38] 研究显示, *Wolbachia* 感染显著降低了细菌属水平的多样性和丰度,具体表现为细菌多样性降低了 43%, Shannon 指数从 2.99 降至 1.72;此外, *Wolbachia* 还改变了细菌群落的结构和组成,导致某些细菌的丰度发生变化,这表明 *Wolbachia* 可能通过抑制某些细菌并促进其他细菌来影响宿主的微生物群落,并且该研究还发现, *Wolbachia* 对肠杆菌科细菌属的丰度影响尤为明显, *Wolbachia* 和欧文氏菌属(*Erwinia*)呈负相关关系,但与普罗威登斯菌属(*Providencia*)和沙门氏菌属(*Serratia*)呈正相关关系。*Wolbachia* 作为一种内共生细菌,在营养和能量获取方面极度依赖宿主^[39]。本研究中,烟草甲幼虫肠道中 *Wolbachia* 在 SL 组、YC 组和 WF 组中的占比分别为 13.07%、87.09%和 1.62%,鉴于 SL 组与 YC 组中 *Wolbachia* 丰度差异显著(表 6),这种丰度差异极有可能对肠杆菌科 *Enterobacter* 的丰度产生影响,SL 组的 *Enterobacter* 占比为

61.43%,在 YC 组中仅为 0.02%,而 WF 组中则未检测到 *Enterobacter* 的存在。在 WF 组中, *Wolbachia* 含量极少,而 *Arsenophonus* 占比高达 97.91%,因此推测高丰度 *Arsenophonus* 可能抑制了 *Wolbachia* 的生存,不过具体作用机制仍有待深入探究。现有研究表明,食物摄入显著影响了 *Wolbachia* 的丰度,具体表现为高酵母饮食降低了 *Wolbachia* 的丰度,而高蔗糖饮食则增加了 *Wolbachia* 的丰度^[40]。在本研究中,SL 组的食物由小麦粉、麦麸和酵母粉组成,小麦与酵母的协同作用使得该组烟草甲幼虫肠道内的 *Wolbachia* 维持在较低水平。此外,在 YC 组中,烟草甲幼虫的食物以烤烟粉末和麦麸为主,YC 组中的高蔗糖低酵母成分可能有助于 *Wolbachia* 的繁殖,本研究结果与前人发现相一致。

Arsenophonus 属于变形菌门(*Proteobacteria*) γ -变形菌纲肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)^[41]。该属细菌的寄主范围极为广泛,是昆虫、蜘蛛等肠道内常见的共生菌^[42]。*Arsenophonus* 的共生菌能够与多种昆虫建立共生关系,例如褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stal)^[43]和白蜡虫(*Ericerus pela* Chavannes)^[44]。在烟粉虱(*Bemisia tabaci* Gennadius)中,未感染 *Arsenophonus* 的烟粉虱主要取食甜辣椒(*Capsicum annuum* Linn)、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn)、南瓜(*Cucurbita moschata* Duchesne)和茄子(*Solanum melongena*)等,而感染了 *Arsenophonus* 的烟粉虱主要取食棉花(*Gossypium hirsutum* Linn)和鼠尾草(*Salvia japonica* Thunb)^[45];研究发现,被寄生蜂(*Psyllaphaegus bliteus* Riek)寄生的木虱(*Psyllidae*)幼虫感染 *Arsenophonus* 的概率低于未被寄生的木虱幼虫^[46]。除此之外, *Arsenophonus* 在玉米花翅飞虱(*Peregrinus maidis* Ashmead)体内主要参与维生素 B 和必需氨基酸的合成。研究表明,这种细菌能够补充 *P. maidis* 体内维生素 B1、B2、B6、B7 和 B9 的生物合成途径,并且在苏氨酸和赖氨酸的合成过程中起到关键作用^[47]。

本研究发现,在烟草甲幼虫的肠道,SL组、YC组和WF组中*Arsenophonus*的占比分别为0、0.000 9%和97.91% (表6)。这一结果表明,食物种类对烟草甲幼虫体内的*Arsenophonus*含量有显著影响。由于WF组的食料仅由烤烟构成,食物来源单一,而*Arsenophonus*在WF组中占据绝对优势,推测其可能为野生环境下的烟草甲幼虫合成维生素B和氨基酸。另外,*Arsenophonus*分泌的共生毒素,包括去泛素化酶(如spaid-like和CifB)能够调节宿主细胞内的信号传导途径,尤其是与应激反应和免疫反应相关的途径^[48]。本研究中,WF组内烤烟食料含有大量生物碱,如烟碱等不利于烟草甲幼虫生长发育的物质,WF组生存环境比SL组和YC组更为恶劣,根据*Arsenophonus*在WF组烟草甲幼虫体内的高表达推测出*Arsenophonus*可能增强烟草甲对环境压力的适应能力,提高烟草甲的生存率(图6C)。

4 结论

本研究探讨了3种不同食料对烟草甲幼虫肠道细菌群落结构的影响。通过16S rRNA基因全长扩增子测序和RT-qPCR技术,系统分析了SL组、YC组和WF组幼虫肠道菌群的结构差异。结果显示,SL组、YC组和WF组分别鉴定出174、115、62个OTUs。 α 多样性指数(包括Sobs、Chao1、ACE、Shannon和Simpson指数)均表明SL组>YC组>WF组,并且组间差异显著($P<0.05$)。在属水平上,SL组的优势菌为肠杆菌属(*Enterobacter*, 61.43%);YC组以*Wolbachia* (87.09%)为主;WF组则由*Arsenophonus* (97.91%)占绝对优势。RT-qPCR结果进一步证实,*Enterobacter*、*Wolbachia*和*Arsenophonus*的相对丰度与测序数据一致。本研究采用传统微生物分离培养法,利用纤维素筛选培养基、LB培养基、2.0 g/L烟草浸出液培养基以及2.0 g/L烟碱培养基这4种具有不同功能特性的筛选培养基,从烟草甲幼虫肠道中成

功分离并纯化出13株细菌(图7)。经形态观察及分子鉴定(表9、10),结果显示:泛菌属2株,不动杆菌属5株,微小杆菌属2株,肠球菌属3株,肠杆菌属1株。通过RT-qPCR验证结合体外分离实验,所得结果与16S全长扩增子测序技术结果相吻合。综上所述,食料类型显著改变了烟草甲幼虫肠道细菌的种类组成、群落结构特征及多样性水平。

作者贡献声明

万子凌:方案设计,实验操作,数据处理,撰写文章,修改文章;李艳青:协助实验操作;李昂:修改文章;彭琛:提供资源、项目管理;梁增发:提供资源、监督指导;黄嘉杰:项目监管;金丰良:实验设计、实验指导、文章指导;许小霞:方案设计,实验指导,修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] ARBOGAST RT, KENDRA PE, MANKIN RW, McDONALD RC. Insect infestation of a botanicals warehouse in north-central Florida[J]. Journal of Stored Products Research, 2002, 38(4): 349-363.
- [2] 齐禹哲. 对烟草甲高毒力白僵菌菌株筛选及其应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2021.
- [3] QI YZ. Screen and application of a high-virulence *Beauveria bassiana* strain against *Lasioderma serricorne*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [4] 宋纪真, 冯大成. 全国贮烟害虫危害程度的调查研究[J]. 烟草科技, 1995, 28(4): 26-30.
- [5] SONG JZ, FENG DS. Investigation and study on the degree of damage of tobacco storage pests in China[J]. Tobacco Science & Technology, 1995, 28(4): 26-30 (in Chinese).
- [6] BLANC M, KAELIN P, GADANI F. *Bacillus thuringiensis* (Bt) for the control of insect pests in stored tobacco: a review[J]. Beiträge Zur Tabakforschung International, 2002, 20(1): 15-22.
- [7] SHIN SC, KIM SH, YOU H, KIM B, KIM AC, LEE KA, YOON JH, RYU JH, LEE WJ. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling[J]. Science, 2011, 334(6056): 670-674.
- [8] 张帅帅, 南小宁, 王云果, 朱兰芳, 贺虹. 基于PCR-DGGE技术的3种植食性叶蜂幼虫肠道细菌群落结构分析[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(5):

- 154-160.
ZHANG SS, NAN XN, WANG YG, ZHU LF, HE H. Gut bacteria flora from three kinds of herbivorous sawfly larvae based on PCR-DGGE technology[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(5): 154-160 (in Chinese).
- [7] AYAYEE PA, LARSEN T, ROSA C, FELTON GW, FERRY JG, HOOVER K. Essential amino acid supplementation by gut microbes of a wood-feeding cerambycid[J]. Environmental Entomology, 2016, 45(1): 66-73.
- [8] PANG XJ, XIAO XP, LIU Y, ZHANG RD, LIU JY, LIU QY, WANG PH, CHENG G. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16023.
- [9] 张振宇, 圣平, 黄胜威, 赵永顺, 张宏宇. 昆虫肠道微生物的多样性、功能及应用[J]. 生物资源, 2017, 39(4): 231-239.
ZHANG ZY, SHENG P, HUANG SW, ZHAO YS, ZHANG HY. Diversity, function and application of insect gut microbiota[J]. Biotic Resources, 2017, 39(4): 231-239 (in Chinese).
- [10] LUO ZW, DONG ZX, CHEN YF, LI HY, TANG QH, LI JL, GUO J. Comparative analysis of the gut microbiota of *Apis cerana* in Yunnan using high-throughput sequencing[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(9): 2557-2567.
- [11] SIDDIQUI JA, KHAN MM, BAMISILE BS, HAFEEZ M, QASIM M, RASHEED MT, RASHEED MA, AHMAD S, SHAHID MI, XU YJ. Role of insect gut microbiota in pesticide degradation: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 870462.
- [12] BERASATEGUI A, SALEM H, PAETZ C, SANTORO M, GERSHENZON J, KALTENPOTH M, SCHMIDT A. Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness[J]. Molecular Ecology, 2017, 26(15): 4099-4110.
- [13] 王渭霞, 朱廷恒, 赖凤香. 昆虫共生微生物及其功能研究进展[J]. 昆虫学报, 2021, 64(1): 121-140.
WANG WX, ZHU TH, LAI FX. Research advances in symbiotic microorganisms in insects and their functions[J]. Acta Entomologica Sinica, 2021, 64(1): 121-140 (in Chinese).
- [14] Muhammad Fahim Raza. 肠道微生物促进宿主桔小实蝇成虫抵抗低温胁迫的分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Muhammad Fahim Raza. The molecular mechanisms of gut microbiota promote host resistance to low temperature stress in adult *Bactrocera dorsalis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [15] 谭周进, 谢丙炎, 肖启明, 杨宇红, 冯兰香. 烟粉虱内共生菌 *groEL* 基因的 PCR 扩增与测序[J]. 核农学报, 2005, 19(1): 68-71, 54.
TAN ZJ, XIE BY, XIAO QM, YANG YH, FENG LX. PCR amplifying and sequencing of *groEL* gene from endosymbionts in *Bemisia tabaci*[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2005, 19(1): 68-71, 54 (in Chinese).
- [16] RUOKOLAINEN L, IKONEN S, MAKKONEN H, HANSKI I. Larval growth rate is associated with the composition of the gut microbiota in the Glanville fritillary butterfly[J]. Oecologia, 2016, 181(3): 895-903.
- [17] PRIYA NG, OJHA A, KAJLA MK, RAJ A, RAJAGOPAL R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30768.
- [18] LÜ J, GUO W, CHEN SM, GUO MJ, QIU BL, YANG CX, LIAN TX, PAN HP. Host plants influence the composition of the gut bacteria in *Henosepilachna vigintioctopunctata*[J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0224213.
- [19] 邓竣丹, 王海超, 许维康, 徐乐天, 唐燕平, 张龙娃. 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.
DENG JD, WANG HC, XU WK, XU LT, TANG YP, ZHANG LW. 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 (in Chinese).
- [20] RYAN L. Post-harvest Tobacco Infestation Control[M]. London: Chapman & Hall, 1995.
- [21] DOWD PF. *In situ* production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts in the cigarette beetle (*Coleoptera: Anobiidae*)[J]. Journal of Economic Entomology, 1989, 82(2): 396-400.
- [22] DOWD PF, SHEN SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*)[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1990, 56(3): 241-248.
- [23] 薛宝燕, 程新胜, 魏重生, 陈树仁, 周邦. 烟草甲体内共生菌的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(4): 270-271.
XUE BY, CHENG XS, WEI CS, CHEN SR, ZHOU Z. Primary study on the symbionts from the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2005, 17(4): 270-271 (in Chinese).
- [24] 薛宝燕, 程新胜, 魏重生, 陈树仁, 周邦. 食料对烟草甲共生菌数量和生长发育的影响[J]. 昆虫知识, 2006, 43(1): 50-53.
XUE BY, CHENG XS, WEI CS, CHEN SR, ZHOU Z. Effect of diets on abundance of yeast-like symbionts and development of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2006, 43(1): 50-53 (in Chinese).
- [25] 符运会, 屈建航, 张璐洁, 马文文, 卢斌斌, 李海峰. 不同培养基凝固剂对水体沉积物中可培养细菌多样性的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(9): 1787-1793.
FU YH, QU JH, ZHANG LJ, MA WW, LU BB, LI HF. Effects of different medium coagulators on diversity of culturable bacteria in water sediments[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(9): 1787-1793 (in Chinese).
- [26] LI MY, HUANG Y, LEI X, XU CT, LI B, CHEN DX, LIU S. Identification of six heat shock protein 70 genes in *Lasioderma serricorne* (*Coleoptera: Anobiidae*) and their responses to temperature stress[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2021, 24(3): 597-605.
- [27] 林叶邦, 徐蕾, 杨振德, 韦善方. 3种核桃寄主对云斑天牛肠道可培养细菌多样性的影响[J]. 山东农业科学, 2023, 55(5): 94-100.
LIN YB, XU L, YANG ZD, WEI SF. Effects of three walnut host species on diversity of culturable bacteria in intestinal tract of *Batocera horsfieldi*[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(5): 94-100 (in Chinese).

- [28] DILLON RJ, CHARNLEY AK. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: *in vivo* production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 66(1): 72-75.
- [29] 卓凤萍, 陈仕江, 殷幼平, 王中康, 夏玉先. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道菌群的分析[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2004, 27(11): 26-29.
ZHUO FP, CHEN SJ, YIN YP, WANG ZK, XIA YX. Analysis on the *Hepialus gonggaensis*' intestinal bacterial flora[J]. Journal of Chongqing University (Natural Science Edition), 2004, 27(11): 26-29 (in Chinese).
- [30] 刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 616-622.
LIU L, WANG ZK, YU HW, CHEN SJ, YAN GF, XIA YX, YIN YP. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 616-622 (in Chinese).
- [31] 陈亚平, 杜鄂巍, 李亚红, 鲁智慧, 李浩, 桂富荣. 草地贪夜蛾肠道细菌分离鉴定与功能初探[J]. 南方农业学报, 2022, 53(3): 821-829.
CHEN YP, DU EW, LI YH, LU ZH, LI H, GUI FR. Isolation, identification and functional analysis of intestinal bacteria of *Spodoptera frugiperda*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(3): 821-829 (in Chinese).
- [32] 张志红, 张凌英, 苏造堂, 李维薇, 胡慧芬, 黄明亮, 陈思颖, 张生美, 陈斌. 沾益区草地贪夜蛾幼虫肠道可培养细菌分离鉴定[C]//2019年云南草地贪夜蛾绿色防控论文集. 2019: 17-20.
ZHANG ZH, ZHANG LY, SU ZT, LI WW, HU HF, HUANG ML, CHEN SY, ZHANG SM, CHEN B. The identification and isolation of cultivable bacteria from the intestines of *Spodoptera frugiperda* larvae in the grasslands of the Zhanyi District[C]//2019 Yunnan Fall Armyworm Green Control Proceedings. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University: Yunnan Province Plant Protection and Quarantine Station, 2019: 17-20 (in Chinese).
- [33] SRINIVASAN TS, PREMACHANDRAN K, CLINTON PX. Bacterial microbiome associated with cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (F.) and its microbial plasticity in relation to diet sources[J]. PLoS One, 2024, 19(1): e0289215.
- [34] MEREGHETTI V, CHOUAIA B, MONTAGNA M. New insights into the microbiota of moth pests[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11): 2450.
- [35] 靳亮, 王金昌, 王洪秀, 张贱根, 杨罡, 靳海燕. 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术分析茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构及多样性[J]. 江西科学, 2013, 31(6): 759-763, 829.
JIN L, WANG JC, WANG HX, ZHANG JG, YANG G, JIN HY. Bacterial community in midguts of ectopic oblique larvae by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis[J]. Jiangxi Science, 2013, 31(6): 759-763, 829 (in Chinese).
- [36] WANG H, JIN L, ZHANG H. Comparison of the diversity of the bacterial communities in the intestinal tract of adult *Bactrocera dorsalis* from three different populations[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6): 1390-1401.
- [37] SINKINS SP, WALKER T, LYND AR, STEVEN AR, MAKEPEACE BL, J GODFRAY HC, PARKHILL J. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes[J]. Nature, 2005, 436(7048): 257-260.
- [38] OURRY M, CROSLAND A, LOPEZ V, DEROCLES SAP, MOUGEL C, CORTESERO AM, POINSOT D. Influential insider: *Wolbachia*, an intracellular symbiont, manipulates bacterial diversity in its insect host[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1313.
- [39] MARKOV AV, ZAKHAROV IA. The parasitic bacterium *Wolbachia* and the origin of the eukaryotic cell[J]. Paleontological Journal, 2006, 40(2): 115-124.
- [40] SERBUS LR, WHITE PM, SILVA JP, RABE A, TEIXEIRA L, ALBERTSON R, SULLIVAN W. The impact of host diet on *Wolbachia* titer in *Drosophila*[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(3): e1004777.
- [41] GHERNA RL, WERREN JH, WEISBURG W, COTE R, WOESE CR, MANDELCO L, BRENNER DJ. NOTES: *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41(4): 563-565.
- [42] DURON O, BOUCHON D, BOUTIN S, BELLAMY L, ZHOU LQ, ENGELSTÄDTER J, HURST GD. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone[J]. BMC Biology, 2008, 6: 27.
- [43] 陈宇, 陈洋, 王渭霞, 赖凤香, 傅强. 褐飞虱杀雄菌属共生菌 *Arsenophonus* 的传递方式与生物学意义初探[J]. 中国水稻科学, 2014, 28(1): 92-96.
CHEN Y, CHEN Y, WANG WX, LAI FX, FU Q. A preliminary study on the transfer mode and biological significance of endosymbiont *Arsenophonus* in *Nilaparvata lugens*[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2014, 28(1): 92-96 (in Chinese).
- [44] 刘魏魏, 杨璞, 陈晓鸣, 徐冬丽, 李燕飞. 白蜡虫体内杀雄菌属(*Arsenophonus*)共生菌的分子检测[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 1002-1010.
LIU WW, YANG P, CHEN XM, XU DL, LI YF. Molecular detection of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from *Ericerus pela* Chavannes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(8): 1002-1010 (in Chinese).
- [45] CHIEL E, GOTTLIEB Y, ZCHORI-FEIN E, MOZES-DAUBE N, KATZIR N, INBAR M, GHANIM M. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*[J]. Bulletin of Entomological Research, 2007, 97(4): 407-413.
- [46] HANSEN AK, JEONG G, PAINE TD, STOUTHAMER R. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7531-7535.
- [47] WANG YH, MIKAELIAN A, COATES BS, LORENZEN M. The genome of *Arsenophonus* sp. and its potential contribution in the corn planthopper, *Peregrinus maidis*[J]. Insects, 2024, 15(2): 113.
- [48] MASSEY JH, NEWTON ILG. Diversity and function of arthropod endosymbiont toxins[J]. Trends in Microbiology, 2022, 30(2): 185-198.