

丁鹏,刘崇敏,孙作恒,等.可培养肠道细菌对南亚果实蝇生殖力的影响[J].华中农业大学学报,2023,42(2):115-122.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.015

可培养肠道细菌对南亚果实蝇生殖力的影响

丁鹏¹,刘崇敏²,孙作恒²,陈稳²,沈翰韬²,张宏宇¹,张振宇¹,袁伊旻²

1. 华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070; 2. 武汉设计工程学院环境设计学院,武汉 430205

摘要 为明确检疫实蝇害虫南亚果实蝇(*Zeugodacus tau* Walker)雌成虫的肠道优势菌株种类及它们对南亚果实蝇取食能力、营养状态和生殖力的影响,通过平板分离与分子鉴定技术进行可培养菌株的分离与菌种分析,进一步进行抗生素处理与肠道优势菌株回补处理,检测南亚果实蝇取食量、血淋巴氨基酸含量和产卵量。结果显示:清除肠道细菌可显著降低南亚果实蝇雌成虫的产卵量、取食量和血淋巴氨基酸含量,降至正常雌成虫(无抗生素处理,对照)水平的34.9%、43.2%和60.8%。鉴定出的9种可培养菌株,分别隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*),主要分布在肠球菌属(*Enterococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*);而其中的优势菌株为*Enterococcus* sp. ZYY 2-97(57.41%)和*Bacillus* sp. ZYY 1-83(17.59%)。回补ZYY 2-97和ZYY 1-83菌株后南亚果实蝇雌成虫的总产卵量分别显著恢复至对照的75.00%和86.98%,取食量显著恢复至对照水平的117.53%和117.85%,而血淋巴氨基酸含量显著恢复至对照水平的94.80%和87.81%。以上结果表明,肠道细菌可通过调控南亚果实蝇雌成虫的取食能力和营养状态而影响宿主生殖力,而且其中的优势菌株发挥了关键作用。

关键词 南亚果实蝇; 肠道微生物; 可培养菌; 生殖力; 取食能力; 营养状态; 绿色防控

中图分类号 S433 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0115-08

南亚果实蝇(*Zeugodacus tau* Walker)又名南亚寡鬃实蝇,俗称南瓜实蝇、瓜蛆,属双翅目(Diptera)实蝇科(Trypetidae)寡鬃实蝇属(*Zeugodacus*),是一种严重、多食的世界性检疫害虫,主要危害16个科80余种瓜果植物^[1]。南亚果实蝇发育周期短,产卵量大,产卵期长,而且雌成虫刺破瓜皮产卵后,其幼虫取食蔬果,直接影响到蔬果品质和产量,给果蔬产业和对外贸易带来巨大的经济损失^[2]。由于其幼虫特殊的为害方式和成虫强大的飞行和繁殖能力,导致目前以化学防控和诱杀为主的防控效果有限,发生危害面积逐年递增,亟需建立新的防治策略。其中以生殖抑制为基础的防治策略,具有重要的潜在价值^[3]。

昆虫的消化系统中存在丰富多样的细菌群落,在漫长的进化过程中,昆虫与肠道细菌相互影响,形成了相互依存的共生关系^[4]。已经证明,肠道细菌可以调控昆虫寄主的发育、取食、生殖、耐药性等特性^[5-6],且越来越多的研究表明,昆虫的肠道细菌对

其生殖和取食起着重要的调控作用。例如,寄主植物饲养的褐飞虱与人工饲料饲养的褐飞虱肠道主要菌群有明显的不同,且后者的卵巢和睾丸更加发达^[3]。与肠道菌群正常或先去除后回补肠道菌群的亲代果蝇的雌性后代相比,去除肠道菌群的亲代果蝇的后代中雌成虫生殖力更低^[7]。同时,在果蝇中,肠道微生物群可影响宿主的交配和繁殖行为,并对后代的虫重产生跨代影响^[8]。有研究表明,雌性橘小实蝇取食添加分散泛球菌和阴沟肠杆菌的饲料后产卵更多,但寿命更短,而喂食了添加粪肠球菌和产酸克雷伯氏菌的饮食的雌性橘小实蝇寿命更长,但繁殖力较低^[9]。经抗生素处理后柑橘大实蝇的繁殖力显著降低,而给柑橘大实蝇喂食添加了3种细菌菌株(肺炎克雷伯氏菌、布氏柠檬酸杆菌和分散泛菌)的饲料时,雌性繁殖力显著提高^[10]。Augustinos等^[11]发现肠道细菌*Enterobacter* sp. Cc_G_26可提高地中海实蝇的蛹及成虫的生殖能力,并缩短饲养时间。在南亚果实蝇中,已经发现肠道细菌对南亚果实蝇

收稿日期: 2022-10-17

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD1400803);湖北省教育厅科研计划项目(B2019329)

丁鹏, E-mail: 1047796652@qq.com

通信作者: 袁伊旻, E-mail: 87015497@qq.com; 张振宇, E-mail: Zhangzhenyu@mail.hzau.edu.cn

的发育有重要影响,且已分离筛选出对成虫具有显著引诱活性的可培养菌株^[12-13]。然而,南亚果实蝇雌成虫的肠道微生物缺失对其生殖能力造成何种影响,是否存在关键功能细菌仍未可知。

本研究首先通过抗生素清除细菌处理来验证肠道细菌对南亚果实蝇雌成虫生殖力的调节作用,同时分离筛选出肠道细菌中的优势菌株,进一步通过“抗生素-菌落回补”处理验证该优势菌株对雌成虫生殖力的调控作用与可能的调控机制,旨在阐明可培养肠道优势细菌在维持南亚果实蝇生殖力中的重要作用,并初步分析其调控机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验所用南亚果实蝇取自华中农业大学园艺与城市昆虫研究所建立的实验种群,饲养方法如下:初羽化成虫供给足够水分与人工饲料,饲养至性成熟,将新鲜笋瓜放入笼中诱集产卵;幼虫在笋瓜内发育至第3龄老熟幼虫,待其自动跳入放置于笋瓜下的蛭石中化蛹;待其全部化蛹后,使用孔径1.7 mm筛网筛出虫蛹,并转入新的虫箱中羽化;成虫转入养虫笼(30 cm×30 cm×30 cm)内继续饲养,供给足够水分与人工饲料(质量配比为酵母粉:蔗糖=1:1),每3 d更换1次;环境条件控制为温度26~28℃,湿度70%~80%,光周期L:D为14 h:10 h。

1.2 南亚果实蝇肠道解剖与肠道细菌分离

将试验所需的镊子、培养皿预先高温消毒。取羽化7 d的南亚果实蝇雌成虫50头,放于75%乙醇中消毒3 min,用镊子将虫体放入灭菌纯水中搅动漂洗,然后放入培养皿中,加入少许PBS,并置于体视镜下进行解剖;分离出完整的肠道,放入装有1 mL PBS缓冲液的1.5 mL EP管内,研磨均匀后用于肠道细菌的分离培养。

将研磨样品按照标准的10倍微生物溶液梯度稀释方法分别稀释 10^5 、 10^6 、 10^7 倍,并取各个稀释溶液100 μ L转移到LB固体培养皿上并涂抹均匀,于室温28℃培养24 h后挑选最优稀释度,在每个培养皿随机挑选30~50个菌落,分别转移至新的LB固体培养基上进行划线培养,挑取独立的单菌落,再转移至LB液体培养基中培养18~24 h,与无菌的甘油(终质量分数为25%)混匀后置于-80℃低温保存,用于后期的菌种鉴定。

1.3 肠道细菌的分子鉴定

使用LB液体培养基培养获得的新鲜菌液进行单菌落的菌液PCR,使用引物27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3')扩增16S rDNA序列^[14];PCR体系组成为:PrimeSTAR HS(Code R040Q; TaKaRa)20 μ L、引物27F与1492R各1 μ L、ddH₂O 14 μ L、DNA裂解液(Code 9164; TaKaRa)4 μ L。通过生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序(Sanger法)获得PCR产物的DNA序列。

测序获得的16S rDNA序列通过EzBioCloud在线分析工具(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)比对quality-controlled databases of 16S rDNA sequences^[15],依据序列相似度对分离株进行初步鉴定;随后通过MEGA 7(Pennsylvania State University)进行基于最大似然法(1000 bootstrap replicates)的系统进化发育分析,确定其属名^[16]。

1.4 抗生素处理与肠道细菌回补试验

为了比较抗生素处理与肠道细菌回补效果,设置抗生素处理组、肠道细菌回补组、对照组。3组饲养情况如下:

对照组:使用人工饲料+无菌水饲喂南亚果实蝇雌成虫,按本文“1.1”所述方法正常饲养。

抗生素处理组:根据Raza等^[14]报道的抗生素组合,通过预实验筛选出最佳的质量浓度组合为青霉素0.6 mg/mL+链霉素1 mg/mL。进行抗生素处理时,首先将初羽化南亚果实蝇雌成虫在本文“材料与方法1.1”所述方法正常人工饲料下饲养5 d,随后转移至正常人工饲料+抗生素无菌水的饲养条件下饲养5 d,再转移至正常人工饲料+无菌水的饲养条件下饲养至试验结束,需每天更换新饲料与无菌水。

肠道细菌回补组:将初羽化南亚果实蝇雌成虫在正常饲养条件下饲养5 d,随后转移至正常人工饲料+抗生素无菌水的饲养条件下连续饲养5 d,再转移至添加肠道细菌的人工饲料(每克人工饲料100 μ L菌液)+无菌水的饲养条件下连续饲养至虫体死亡,每天更换新饲料与无菌水。

1.5 产卵量、取食量与血淋巴氨基酸含量的检测

为测定雌成虫产卵量,将同一批次南亚果实蝇雌雄虫分开后,初羽化雄成虫使用人工饲料+无菌水饲养13 d,初羽化雌成虫按照本文“材料与方法1.4”中的不同处理饲养至13 d,随后将2对同一批次的雌雄成虫转移到设置好的自制数卵器中,将笋瓜

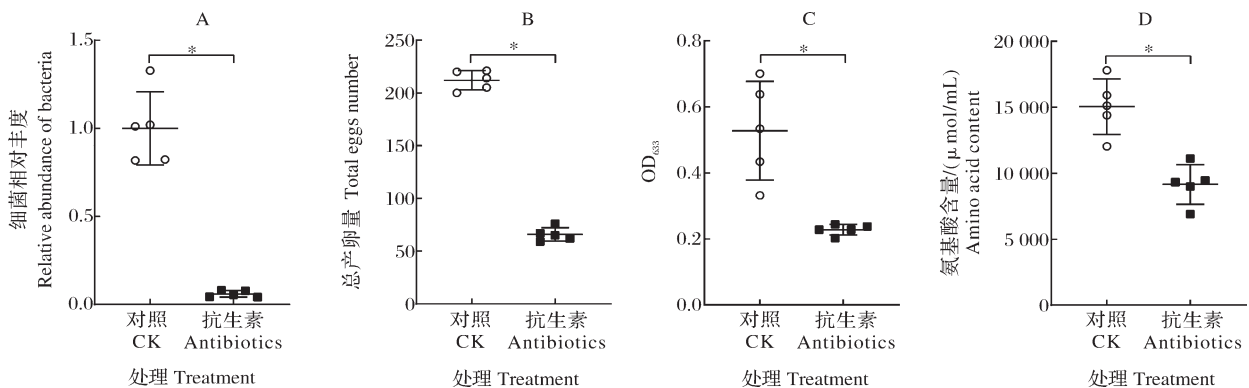
置于数卵器底部吸引雌虫,每2 d统计1次产卵量,并更换笋瓜和饲料,持续记录10 d数据。

取食量的检测方法参照 Vijendravarma 等^[17],具体操作步骤为:饥饿处理南亚果实蝇雌成虫12 h后,使用添加0.16%食用亮蓝的液体人工饲料(3.33%酵母浸出物和10%的蔗糖,121℃高压灭菌20 min)喂食雌成虫30 min;取5头取食后的雌成虫,转移到装有1 mL PBS和10粒钢珠(直径2 mm)的2 mL离心管内,在研磨仪(JXFSTPRP-L,上海净信实业发展有限公司)中研磨60 s,研磨频率为60 Hz;4℃、12 000 r/min离心2 min,将900 μL上清液转移至新离心管,并加水至1.5 mL,混匀;再4℃、12 000 r/min离心2 min,吸取100 μL上清液至96孔板,在多功能酶标仪(Infinite® M200, Tecan)上测定染料含量,即633 nm波长下吸光值(OD₆₃₃);通过吸光值大小来比较不同处理之间取食量的差异。

血淋巴总氨基酸浓度测定使用基于比色法(650 nm)的总氨基酸测定试剂盒(A026-1-1,南京建成生物工程研究所)并参照使用说明完成。

1.6 数据分析

本研究所有试验设置5个生物重复,试验数据均



* 表示在抗生素组和对照组之间具有显著差异($P < 0.05$)。* Indicated the significant difference between antibiotics treatment and CK.

图1 抗生素处理下南亚果实蝇雌成虫肠道细菌数量(A)、产卵量(B)、取食量(C)和血淋巴氨基酸含量(D)

Fig.1 The abundance of intestinal bacteria (A), oviposition (B), food consumption (C), and haemolymph amino acid contents (D) of female adults of *Zeugodacus tau* after the antibiotic-treatment

2.2 可培养肠道细菌的分离与分子鉴定

对平板分离培养获得的196个单菌落进行菌落形态、16S rDNA片段序列的EzBio Cloud在线分析和系统进化分析,结果发现196个单菌分别属于变形菌门Proteobacteria(75.93%)和厚壁菌门Firmicutes(24.08%)的9种菌株,包括6个属,其中主要菌属为肠球菌属 *Enterococcus* (58.34%)、肠杆菌属 *Enterobacter* (17.60%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (17.59%) (表1)。而在所有可培养菌株中,丰度最高的是ZYY 2-

表示为“平均值±标准差”。统计分析使用SPSS (Version 22.0)完成;对于2个独立样本,其均值比较采用Student's *t*-test;对于不同处理组之间比较(单因素多水平比较)采用单因素方差分析(one-way ANOVA, post-hoc Tukey's honestly significant difference test);显著性检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。采用GraphPad Prism 5.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 清除肠道细菌对南亚果实蝇雌成虫的生殖、取食、营养的影响

抗生素处理5 d后,南亚果实蝇雌成虫的肠道细菌数量显著降低至无抗生素对照组的5.99% ($P < 0.05$, Student's *t*-test; 图1A),表明抗生素成功清除了绝大部分的肠道细菌。进一步检测结果显示:抗生素处理组的南亚果实蝇雌成虫的总产卵量、取食量和血淋巴游离氨基酸含量分别显著降低为对照组的34.9%、43.2%和60.8% ($P < 0.05$, Student's *t*-test; 图1B~D),表明肠道细菌对南亚果实蝇雌成虫的生殖力、取食能力乃至营养状态具有显著的调控作用。

97(57.41%)和ZYY 1-83(17.59%),分别隶属于肠球菌属和芽孢杆菌属(图2)。其余7种菌株的物种鉴定结果见表1。

2.3 可培养优势菌对南亚果实蝇雌成虫的生殖、取食、营养的影响

与正常对照(CK)相比,抗生素清除肠道细菌后(抗生素组)南亚果实蝇雌成虫的总产卵量、取食量和血淋巴氨基酸含量皆显著降为对照组的31.00%、62.24%和59.69% ($P < 0.05$, post-hoc Tukey's hon-

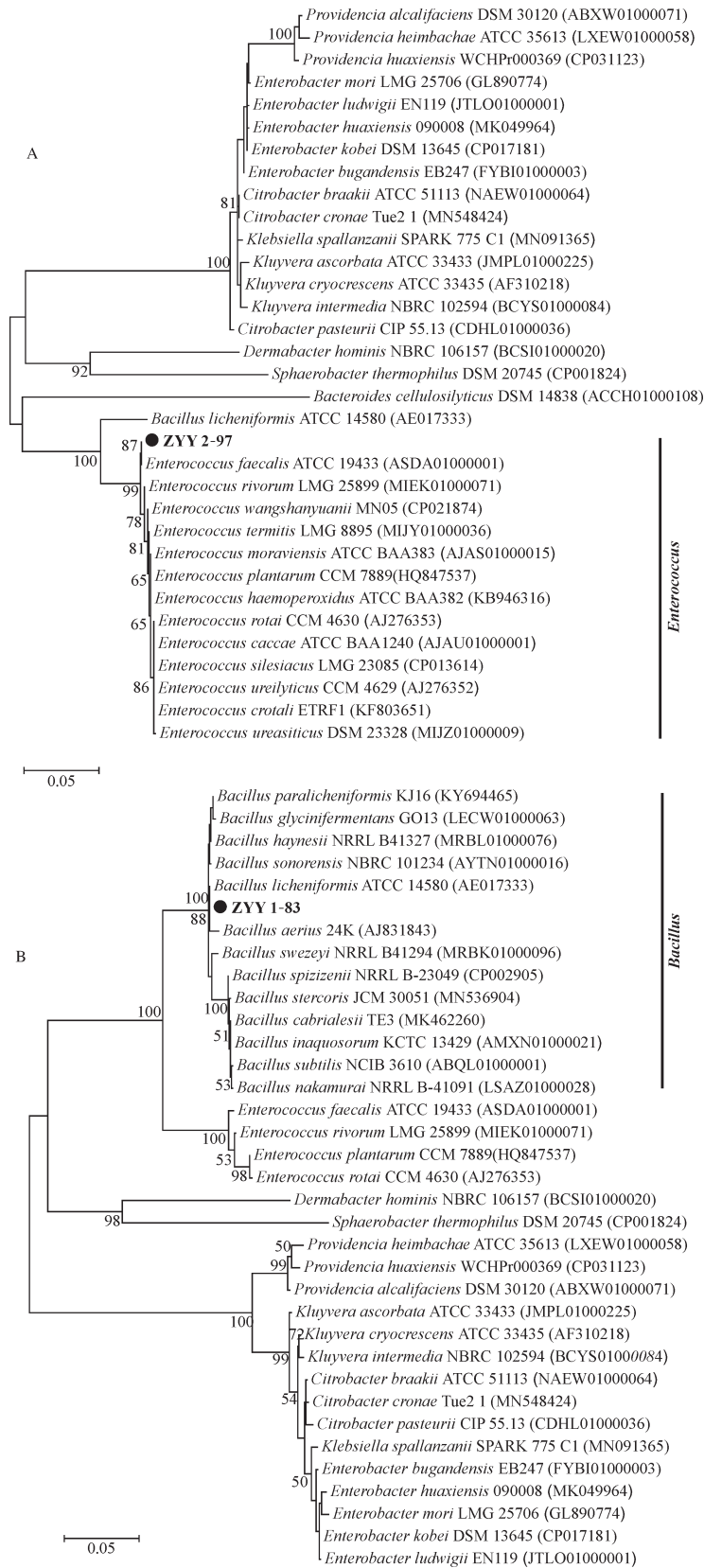


图 2 基于 ZYY 2-97 (A)、ZYY 1-83 (B) 及其相关菌种的 16S rDNA 序列的系统进化树
 Fig. 2 Phylogenetic analysis based on partial 16S rDNA sequence of ZYY 2-97 (A), ZYY 1-83 (B) and other homologous bacterial strains

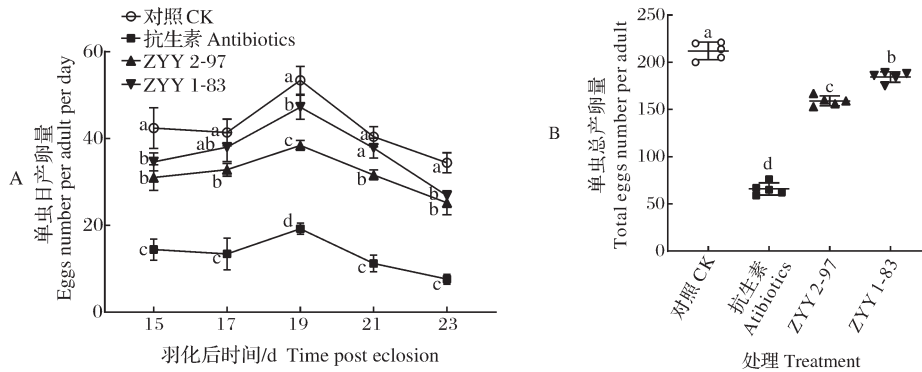
表1 可培养菌的基本信息

Table 1 Basic information of the cultivated bacterial strains

菌株 Strain	占比/% Proportion	基因序列号 Genbank number	门 Phylum	属 Genus
ZYY 1-30	0.93	ON428671	Proteobacteria	<i>Kluyvera</i>
ZYY 1-69	3.70	ON428672	Proteobacteria	<i>Providencia</i>
ZYY 1-83	17.59	ON428673	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
ZYY 2-97	57.41	ON428674	Firmicutes	<i>Enterococcus</i>
ZYY 2-67	0.93	ON428675	Firmicutes	<i>Enterococcus</i>
ZYY 3-21	1.85	ON428676	Proteobacteria	<i>Citrobacter</i>
ZYY 3-13	7.41	ON428677	Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>
ZYY 3-29	9.26	ON428678	Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>
ZYY 3-30	0.93	ON428679	Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>

estly significant difference test; 图3~5)。
而回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后, 雌成虫每 2 d

的产卵量均显著高于清除肠道细菌的抗生素组, 同时绝大多数情况下显著低于对照组(除了回补 ZYY 1-83 组在第 17 天和第 21 天的产卵量与对照组无显著差异)(图 3A); 而回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 组的总产卵量分别显著恢复至对照的 75.00% 和 86.98%, 且回补 ZYY 1-83 组的总产卵量显著高于回补 ZYY 2-97 组(图 3B) ($P < 0.05$, post-hoc Tukey's honestly significant difference test); 在取食量指标上, 回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后雌成虫的取食量水平均显著高于清除肠道细菌的抗生素组 ($P < 0.05$, post-hoc Tukey's honestly significant difference test), 分别恢复至对照的 117.53% 和 117.85%, 但与对照均无显著差异 ($P > 0.05$, post-hoc Tukey's honestly significant difference test)(图 4)。



不同小写字母表示在不同处理组之间具有显著差异 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters denote significant differences between different treatments ($P < 0.05$)。

图3 回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后南亚果实蝇雌成虫日产卵量(A)和总产卵量(B)

Fig. 3 The daily (A) and total laid eggs(B) of female adults of *Z. tau* after the supplementation of ZYY 2-97 and ZYY 1-83

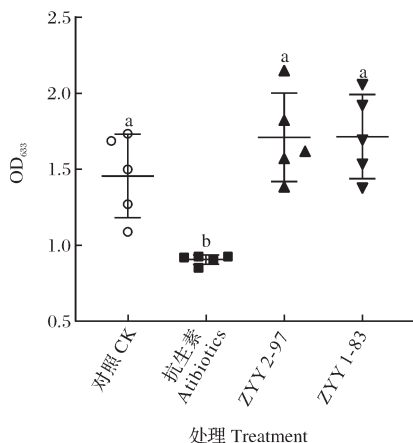


图4 回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后南亚果实蝇雌成虫取食量

Fig. 4 Food consumption of female adults of *Z. tau* after the supplementation of ZYY 2-97 and ZYY 1-83

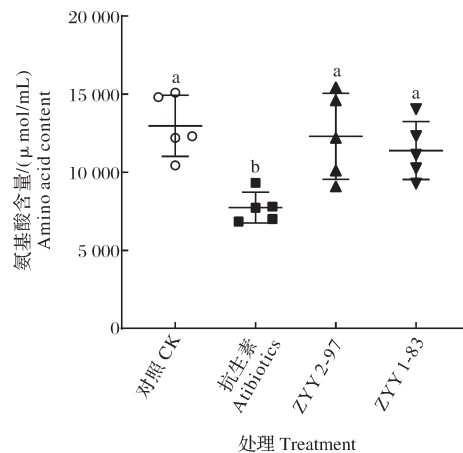


图5 回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后南亚果实蝇雌成虫血淋巴氨基酸含量

Fig. 5 Amino acid contents of female adults of *Z. tau* after the supplementation of ZYY 2-97 and ZYY 1-83

相似地,回补 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 后雌成虫的血淋巴氨基酸水平均显著高于抗生素组 ($P < 0.05$, post-hoc Tukey's honestly significant difference test),分别恢复至对照的 94.80% 和 87.81%,但与对照均无显著差异 ($P > 0.05$, post-hoc Tukey's honestly significant difference test)(图 5)。

以上结果表明,优势可培养菌株 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83 对于南亚果实蝇雌成虫的生殖、取食行为以及营养状态都具有显著的调控作用。

3 讨论

本研究分离培养在南亚果实蝇雌成虫可培养肠道微生物分别隶属于厚壁菌门(75.92%)和变形菌门(24.08%),其中肠球菌属(58.3%)、肠杆菌属(17.60%)、芽孢杆菌属(17.59%)为优势菌属。这与对其他南亚果实蝇或其他实蝇相关的研究结果有一定差异^[12-13,15]。例如,Luo 等^[13]从雌性和雄性南亚实蝇肠道中培养分离得到的优势菌群为变形菌门;Khan 等^[18]从孟加拉国的雌性南亚果实蝇雌成虫中肠中分离并鉴定的 8 个细菌属也都属于变形菌门。该差异可能是由于在不同饲养条件和环境下实蝇成虫肠道菌群结构变异较大造成的^[19]。

本研究发现抗生素清除雌成虫的肠道细菌之后南亚果实蝇雌成虫的取食量、氨基酸含量和产卵量均显著下降,这表明肠道细菌对于南亚果实蝇雌成虫的生殖能力具有重要的调节作用,且可能是通过影响取食从而调节营养状态(氨基酸的吸收与转化)而实现。在其他的实蝇害虫中也有类似的发现。例如,Goane 等^[20]通过添加抗生素清除雌性南美按实蝇(*Anastrepha fraterculus*)的肠道细菌会显著抑制其生殖力,且与蛋白质和脂质储备的减少有关。在南亚果实蝇中,抗生素清除幼虫的肠道微生物后也显著影响了雌成虫的卵巢发育^[21]。我们的研究结果也证明了肠道细菌可以通过调控南亚果实蝇的取食行为和营养状态,从而影响其生殖能力。综合这些现象,我们推测在实蝇类害虫中这种基于“肠道细菌-宿主取食与营养-宿主生殖力”的调控机制是普遍存在的。

通过抗生素清除后菌株回补试验证明肠道菌群优势菌株 *Enterococcus* sp. ZYY 2-97 (57.41%)、*Bacillus* sp. ZYY 1-83 (17.59%) 都可以显著恢复南亚果实蝇雌成虫的生殖力、取食能力和营养状态,表明这 2 个菌株在维持南亚果实蝇雌成虫正常取食和营

养状态进而维持其生殖力的过程中发挥了重要作用。类似的现象也已在其他昆虫中得到证实。例如,包括肠球菌在内的肠道细菌可以影响鳞翅目昆虫的消化酶活力^[22-23]。接种肠球菌 FAW 2-1 的草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)幼虫在斑豆饲料中表现出虫重增加等更好的营养状况^[24]。此外,还有研究者从柚干褐天牛(*Stromatium barbatum*)肠道细菌中鉴定出芽孢杆菌属、肠球菌属、短杆菌属等细菌,并发现它们表现出蛋白水解酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶和脂肪酶活性^[25]。因此我们推测,肠球菌以及芽孢杆菌菌群在南亚果实蝇的肠道中对营养大分子物质进行分解,有利于实蝇对营养物质的吸收,为生殖发育提供充足的营养。未来进一步分析这 2 个菌株发酵雌成虫食物的能力及其发酵产物的营养成分,将有助于探究该菌株调控南亚果实蝇生殖力的机制。

本研究筛选出了对南亚果实蝇雌成虫的生殖力具有重要作用的优势可培养菌株 ZYY 2-97 和 ZYY 1-83,然而根据 16S rDNA 序列仅能将其鉴定到属,不能鉴定到种。在未来,还需要进一步通过测定生化指标进行菌种鉴定。对于 *Bacillus* 属菌种,也可以通过 *gyrA* (DNA gyrase subunit A) 序列进行物种鉴定^[26]。

综上所述,本研究证明了肠道细菌对于维持南亚果实蝇雌成虫的正常取食、营养状态和生殖力都具有重要作用,而在可培养细菌中,隶属于肠球菌属和芽孢杆菌属的优势菌株在其中发挥了关键作用。该结果可为深入研究“肠道细菌-宿主营养-宿主生殖”的调控机制提供重要的可培养菌株和宿主体系,不仅有利于对该调控机制的深入探索,也为基于肠道微生物调控的实蝇类害虫绿色防控新策略提供了理论基础。

参考文献 References

- [1] JALEEL W, LU L H, HE Y R. Biology, taxonomy, and IPM strategies of *Bactrocera tau* Walker and complex species (Diptera: Tephritidae) in Asia: a comprehensive review [J]. Environmental science and pollution research, 2018, 25 (20): 19346-19361.
- [2] TAN M H, ZHANG R, XIANG C Y, et al. The complete mitochondrial genome of the pumpkin fruit fly, *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) [J]. Mitochondrial DNA part A, 2016, 27 (4): 2502-2503.
- [3] LI H W, ZHAO C W, YANG Y, et al. The influence of gut Mi-

- crobiota* on the fecundity of *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) [J/OL]. Journal of insect science, 2021, 21(4): 15 [2022-10-17]. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab061>.
- [4] JORDAN H R, TOMBERLIN J K. Microbial influence on reproduction, conversion, and growth of mass produced insects[J]. Current opinion in insect science, 2021, 48: 57-63.
- [5] FUSETTO R, DENECKE S, PERRY T, et al. Partitioning the roles of CYP6G1 and gut microbes in the metabolism of the insecticide imidacloprid in *Drosophila melanogaster* [J/OL]. Scientific reports, 2017, 7: 11339 [2022-10-17]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09800-2>. DOI: 10.1038/s41598-017-09800-2.
- [6] BEHAR A, YUVAL B, JURKEVITCH E, et al. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity [J]. Journal of insect physiology, 2008, 54(9): 1377-1383.
- [7] NGUYEN B, THAN A, DINH H, et al. Parental *Microbiota* modulates offspring development, body mass and fecundity in a polyphagous fruit fly [J/OL]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1289 [2022-10-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32846933/>. DOI: 10.3390/microorganisms8091289.
- [8] MORIMOTO J, SIMPSON S J, PONTON F. Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster* [J/OL]. Biology letters, 2017, 13(7): 20160966 [2022-10-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28724687/>. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0966.
- [9] AKAMI M, REN X M, QI X W, et al. Symbiotic bacteria motivate the foraging decision and promote fecundity and survival of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J/OL]. BMC microbiology, 2019, 19(1): 229 [2022-10-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31640545/>. DOI: 10.1186/s12866-019-1607-3.
- [10] RASHID M A, ANDONGMA A A, DONG Y C, et al. Effect of gut bacteria on fitness of the Chinese citrus fly, *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) [J]. Symbiosis, 2018, 76(1): 63-69.
- [11] AUGUSTINOS A A, KYRITSIS G A, PAPAPOULOS N T, et al. Exploitation of the medfly gut *Microbiota* for the enhancement of sterile insect technique: use of *Enterobacter* sp. in larval diet-based probiotic applications [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136459 [2022-10-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26325068/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0136459.
- [12] NOMAN M S, SHI G, LIU L J, et al. Diversity of bacteria in different life stages and their impact on the development and reproduction of *Zeugodacus tau* (Diptera: Tephritidae) [J]. Insect science, 2021, 28(2): 363-376.
- [13] LUO M J, ZHANG H H, DU Y G, et al. Molecular identification of cultivable bacteria in the gut of adult *Bactrocera tau* (Walker) and their trapping effect [J]. Pest management science, 2018, 74(12): 2842-2850.
- [14] RAZA M F, WANG Y C, CAI Z H, et al. Gut microbiota promotes host resistance to low-temperature stress by stimulating its arginine and proline metabolism pathway in adult *Bactrocera dorsalis* [J/OL]. PLoS pathogens, 2020, 16(4): e1008441 [2022-10-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008441>.
- [15] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [16] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular biology and evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [17] VIJENDRAVARMA R K, NARASIMHA S, CHAKRABARTI S, et al. Gut physiology mediates a trade-off between adaptation to malnutrition and susceptibility to food-borne pathogens [J]. Ecology letters, 2015, 18(10): 1078-1086.
- [18] KHAN M, MAHIN A A, PRAMANIK M K, et al. Identification of gut bacterial community and their effect on the fecundity of pumpkin fly, *Bactrocera tau* (Walker) [J]. Journal of entomology, 2014, 11(2): 68-77.
- [19] WANG H X, JIN L, PENG T, et al. Identification of cultivable bacteria in the intestinal tract of *Bactrocera dorsalis* from three different populations and determination of their attractive potential [J]. Pest management science, 2014, 70(1): 80-87.
- [20] GOANE L, SALGUEIRO J, MEDINA PEREYRA P, et al. Antibiotic treatment reduces fecundity and nutrient content in females of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in a diet dependent way [J/OL]. Journal of insect physiology, 2022, 139: 104396 [2022-10-17]. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104396>.
- [21] CAI Z H, YAO Z C, LI Y S, et al. Intestinal probiotics restore the ecological fitness decline of *Bactrocera dorsalis* by irradiation [J]. Evolutionary applications, 2018, 11(10): 1946-1963.
- [22] PANIAGUA VOIROL L R, FRAGO E, KALTENPOTH M, et al. Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 556 [2022-10-17]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00556>.
- [23] BYAPPANAHALLI M N, NEVERS M B, KORAJKIC A, et al. Enterococci in the environment [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2012, 76(4): 685-706.
- [24] CHEN B S, MASON C J, PEIFFER, et al. Enterococcal symbionts of caterpillars facilitate the utilization of a suboptimal diet [J/OL]. Journal of insect physiology, 2022, 138: 104369 [2022-10-17]. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104369>.
- [25] YADAV D S, RANADE Y, SAWANT I, et al. Isolation, identification and functional characterisation of bacteria associated with gut of wood feeding *Stromatium barbatum* (Fabr.) (Coleoptera: Cerambycidae) larvae [J]. International journal of tropical insect science, 2022, 42(3): 2603-2616.
- [26] CHUN J, BAE K S. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences [J]. Antonie van leeuwenhoek, 2000, 78(2): 123-127.

Effect of culturable intestinal bacteria on fecundity of *Zeugodacus tau* (Walker)

DING Peng¹, LIU Chongmin², SUN Zuoheng², CHEN Wen²,
SHEN Hantao², ZHANG Hongyu¹, ZHANG Zhenyu¹, YUAN Yimin²

1.College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.School of Environmental Design, Wuhan Design and Engineering College, Wuhan 430205, China

Abstract To identify the dominant strains in the intestinal tract in female adults of the quarantine fruit fly pest, *Zeugodacus tau* (Walker), and their effects on feeding ability, nutritional status and fecundity, here traditional microorganism isolation and molecular identification techniques were used to isolate and identify the culturable bacteria, and then antibiotic treatment and intestinal dominant strains supplementation were carried out to detect the intake, hemolymph amino acid content and egg production of *Z. tau*. The results indicated that the elimination of intestinal bacteria significantly reduced the oviposition, food intake and hemolymph amino acid content of female adult fruit flies to 34.9%, 43.2% and 60.8% of the control (without antibiotic treatment) levels. Subsequently, 9 cultivable strains were isolated and identified as Proteobacteria and Firmicutes, and are mainly distributed in the genera of *Enterococcus*, *Enterobacter* and *Bacillus*. The dominant strains were *Enterococcus* sp. ZYY 2-97 (57.41%) and *Bacillus* sp. ZYY 1-83 (17.59%). In addition, after supplemented with ZYY 2-97 and ZYY 1-83 strains, the total fecundity of the female adults were significantly recovered to 75.00% and 86.98% of the control level, and the food intake were significantly recovered to 117.53% and 117.85% of the control level, respectively. Meanwhile, the amino acids contents in hemolymph were recovered to 94.80% and 87.81% of the control level. Our findings demonstrated that the intestinal bacteria could affect the fecundity of *Z. tau* by regulating the feeding capacity and nutritional status of the female adults, and the dominant culturable strains play a key role in this process.

Keywords *Zeugodacus tau*; intestinal microorganisms; culturable bacteria; fecundity; feeding ability; nutritional status; green prevention and control

(责任编辑:边书京)