

新疆南疆番茄潜叶蛾生殖共生菌分子检测

孙雨^{1,2}, 梁静^{1,2}, 赵宇^{1,2}, 杨晓东^{1,2}, 杨明禄^{1,2}

¹塔里木大学农学院, 新疆 阿拉尔

²新疆农业有害生物综合治理兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔

收稿日期: 2024年1月23日; 录用日期: 2024年2月22日; 发布日期: 2024年2月29日

摘要

番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* 作为入侵害虫, 危害程度极其严重, 有报道该虫具有孤雌生殖现象。为了探讨其生殖现象, 我们重点是分子检测可能与生殖异常有关的内共生菌, 并确定其是否会发生孤雌生殖。加入特定引物进行聚合酶链式反应(PCR)特异扩增DNA样本, 评估番茄潜叶蛾成虫或幼虫体内是否存在对应共生菌。在孤雌生殖试验中, 对处女蛾产卵量、卵孵化率、寿命等数据进行记录, 并将其结果与已配对雌性进行比较。我们的研究表明, 虫体中存在一种内共生菌(沃尔巴克氏菌); 在所进行试验的番茄潜叶蛾种群中, 并没有发现孤雌生殖现象, 处女蛾只产不孕卵。

关键词

番茄潜叶蛾, 生殖共生菌, 沃尔巴克氏体, 孤雌生殖

Molecular Detection of Reproductive Symbiotic Bacteria of Tomato Leafminer in Southern Xinjiang

Yu Sun^{1,2}, Jing Liang^{1,2}, Yu Zhao^{1,2}, Xiaodong Yang^{1,2}, Minglu Yang^{1,2}

¹College of Agriculture, Tarim University, Alaer Xinjiang

²Corps Key Laboratory of Comprehensive Management of Agricultural Pests in Southern Xinjiang, Alaer Xinjiang

Received: Jan. 23rd, 2024; accepted: Feb. 22nd, 2024; published: Feb. 29th, 2024

Abstract

As an invasive pest, *Tuta absoluta* (Meyrick) spreads very rapidly and is extremely damaging, and it has been reported that the insect has parthenogenesis. In order to explore its reproductive

phenomenon, we focused on molecular detection of endosymbionts that may be associated with reproductive abnormalities and determine whether parthenogenesis will occur. DNA samples were specifically amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the addition of specific primers to assess the presence or absence of the corresponding symbiotic bacteria in *T. absoluta* adults or larvae. In the parthenogenetic experiment, data on egg production, egg hatchability, and longevity of virgin moths were recorded, and the results were compared with those of paired females. Our results indicate the presence of an endosymbiotic bacterium (*Wolbachia*) in the worm; in the populations of *T. absoluta* we tested, we did not find solitary reproduction, and virgin moths laid only infertile eggs.

Keywords

Tuta absoluta, Reproductive Symbiotic Bacteria, *Wolbachia*, Parthenogenesis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

番茄潜叶蛾是一种世界范围内的重大入侵害虫[1], 原产于南美洲西部, 寄主范围广泛, 主要为番茄科作物, 包括番茄、马铃薯、龙葵和烟草等, 可在多种植物上产卵和发育[2]。其危害表现为对植物叶片形成不规则连片潜道, 影响光合作用; 嫩茎受到潜蛀而多形成龟裂, 影响植株整体发育; 果实受害常导致孔洞和畸形, 使其失去商品价值[3]。该害虫可对寄主植物造成严重损害, 危害严重的大棚危害率可达100% [4]。

自 2017 年 8 月番茄潜叶蛾首次在新疆伊犁地区发现以来, 这一入侵害虫在中国境内迅速扩散[5] [6] [7] [8], 化学药剂是防止番茄潜叶蛾迅速扩延的最常用方法, 但由于其潜叶危害特性, 可以帮助其躲避一部分杀虫剂侵害, 加之农药的过度使用已导致番茄潜叶蛾种群对多种合成杀虫剂产生抗药性。因此, 需要开发特殊的、环境友好型的控制策略, 如昆虫不育技术(SIT)、性诱剂诱杀等, 这些方法正在不断发展并在一些地区取得了初步成果。在这些新兴的防治方法中, 有性生殖是确保其成功的关键焦点。有报道番茄潜叶蛾可以通过孤雌生殖进行无性繁殖[9], 如果番茄潜叶蛾进行孤雌生殖, 那么将会对多种不育技术防治方法效益大大缩减。

孤雌生殖是一种独特的生殖方式, 与昆虫宿主生殖表型相关的 α -蛋白细菌中最具代表性的菌属有沃尔巴克氏菌(*Wolbachia* sp.)和立克次体(*Rickettsia* sp.) [10], 其他与生殖表型相关的菌属还有拟杆菌(*Cardinium* sp.)和螺原体(*Spiroplasma* sp.)等。在这些微生物中, 沃尔巴克氏体被认为是存在最广泛的内共生菌; 据认为, 它感染了一半以上的节肢动物物种[11], 广泛存在于节肢动物的生殖组织中, 据估计约有80%的鳞翅目物种感染了沃尔巴克氏体[12]。

以上所提到的所有生殖内生共生菌通过母体传播可以操纵宿主的性别, 决定繁殖和发育[13], 以加强自身的传播和持久性, 从而有可能达到孤雌生殖效果。

为明确入侵到南疆的番茄潜叶蛾种群是否存在孤雌生殖现象, 首先对三个地区的番茄潜叶蛾进行了生殖共生菌的检测。此外, 在阿拉尔地区, 我们采集了处女蛾进行了饲养观察, 检阅是否存在孤雌生殖现象。研究结果可为迷向技术应用提供理论支撑。

2. 材料与方法

2.1. 供试虫源

番茄潜叶蛾成虫或幼虫来自新疆南疆的阿拉尔市、和田县、库车县的温室大棚，随机选择 60 个个体用于后续实验，孤雌生殖观察实验虫源来自阿拉尔市塔里木大学校园园艺实验站番茄大棚。

2.2. DNA 的提取

番茄潜叶蛾整只成虫或幼虫用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)提取总 DNA，取番茄潜叶蛾虫体组织用液氮研磨成粉末加入到 1.5 mL 离心管中，加入 180 μ L Buffer ACL，再加入 20 μ L Proteinase K 溶液，震荡均匀，56 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 至细胞完全裂解。再加入 200 μ L Buffer CL，充分颠倒混匀；加入 200 μ L 的无水乙醇，充分颠倒混匀；将吸附柱放入收集管中，用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中，静置 2 min，再 10,000 rpm 室温离心 1 min，倒掉收集管中废液。将吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 500 μ L CW1 Solution，10,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管废液。将吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入 500 μ L CW2 Solution，10,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管废液。将吸附柱重新放回收集管中，于 12,000 rpm 室温离心 2min 去残留的 CW2 Solution，取出吸附柱，放入一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 50~200 μ L CE Ruffer 置 3 min，12,000 rpm 室温离心 2 min，收集 DNA 溶液。检测 DNA 样品的质量，DNA 样品的质量和数量用微量分光光度计(k5600)进行了分析。

2.3. 生殖内生菌的分子检测

根据前人的研究成果委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物(表 1)，反应体系 25 μ L，包括上下游引物各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L、2 \times T5 Super PCR Mix (Basic) 12.5 μ L 和 ddH₂O 9.5 μ L，扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 退火 10 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s，35 个循环，72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。取 4 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(北京市六一仪器厂，DYY-12C 型电泳仪)检测，测试了以下细菌共生菌：*Wolbachia* sp.、*Spiroplasma* sp.、*Arsenophonus* sp.、*Cardinium* sp.和 *Rickettsia* sp. [14] [15] [16] [17] [18]。

Table 1. Detection primer sequence, annealing temperature and product sequence length of reproductive endosymbionts
表 1. 生殖内生菌的检测引物序列、退火温度及产物序列长度

共生生物	序列(5'~3')	退火温度($^{\circ}$ C)	长度(bp)
<i>Wolbachia</i> sp.	Wol16S-F CGGGGGAAAAATTTATTGCT	55	700
	Wol16S-R AGCTGTAATACAGAAAGTAAA		
<i>Spiroplasma</i> sp.	Spou1F: GCTTAACTCCAGTTCGCC	55	421
	Spou1R: CCTGTCTCAATGTTAACCTC		
<i>Cardinium</i> sp.	Ch-F: TACTGTAAGAATAAGCACCGGC	60	463
	Ch-R: GTGGATCACTTAACGCTTTTCG		
<i>Rickettsia</i> sp.	RicCS-AF: TTTAGGCTAATGGGTTTTGGTCAT	60	382
	RicCS-AR: TGCCCAAGTTCTTTAACACCTC		
<i>Arsenophonus</i> sp.	ArsF: GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGT	60	581~804
	ArsR2: GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC		

2.4. PCR 产物测序与比对

选取每个地区所得结果的 6 个 PCR 产物进行测序, 一共测序了 18 个阳性 pcr 产物。运用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接校对并提交到 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 系统中, 查找相似性最高的典型菌株并比对。

2.5. 孤雌生殖观察

获得的虫源于养虫室条件(温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $75\% \pm 5\%$, 光周期为 16L: 8D)下继续饲养, 待其化蛹之后单独分离, 蛹羽化后按性别别对其进行分类, 随机抽取种群中的 100 只处女蛾, 在透明塑料杯内单独饲养观察, 每隔 1~2 d 加入蜂蜜水为其保证营养。另外单独抽取 10 只处女蛾, 与同天羽化雄性潜叶蛾进行配对用作对照。在这两种处理中, 每天观察雌性番茄潜叶蛾在植株上的产卵量, 直至死亡。记录了雌虫的产卵量和寿命, 继续观察卵孵化情况。

3. 结果与分析

3.1. 番茄潜叶蛾生殖内共生菌检测

不同地区的样品中都检测到了沃尔巴克氏体(*Wolbachia* sp.)的存在(表 2), 而生殖共生菌螺原体(*Spiroplasma* sp.)、杀雄菌(*Arsenophonus* sp.)、拟杆菌(*Cardinium* sp.)和立克次氏体(*Rickettsia* sp.)检测均为阴性。

Table 2. The positive rate of *Wolbachia* detection in tomato leafminer

表 2. 番茄潜叶蛾沃尔巴克氏体检测阳性率

地区	样品数(只)	<i>Wolbachia</i> sp.阳性数(只)	阳性率(%)
阿拉尔市	60	40	66.6
库车市	60	7	11.6
和田县	60	12	20.0

3.2. 番茄潜叶蛾沃尔巴克氏体序列比对

被检测的 *Wolbachia* sp. 的核苷酸序列一致, 通过 ncbiblast 搜索结果显示与感染 *Wolbachia* (KX146859.1、KX146854.1)的 *Wolbachia* 内共生菌相似度达 100% (表 3)。

Table 3. Comparison results of *Wolbachia* strains and database type strains of tomato leafminer

表 3. 番茄潜叶蛾 *Wolbachia* 菌株与数据库类型菌株对比结果

登录号	菌株名称	相似度(%)
KX146859.1	<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Varroa destructor</i>	100
KX146854.1	<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Varroa destructor</i>	100
KP640341.1	<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Pezothripskellyanus</i>	99.84
JN379606.1	<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Eupteryxmelissae</i>	99.67

3.3. 番茄潜叶蛾孤雌生殖观察

番茄潜叶蛾处女蛾单雌产卵量在 0~19 粒, 平均 2.24 粒, 而雌雄配对处理的单雌产卵量 27~244 粒,

平均 135.8 粒，雌雄配对后的雌虫产卵量显著增加(图 1)。另外，进行雌雄配对的番茄潜叶蛾雌成虫与未进行交配的番茄潜叶蛾雌成虫平均寿命分别为 13.7 天和 23.1 天，雌成虫寿命存在显著差异(图 2)。在未与雄性番茄潜叶蛾进行配对的雌性番茄潜叶蛾的所产卵中，均未发现卵粒孵化，卵在一定时间后，变为干瘪，失去活力。

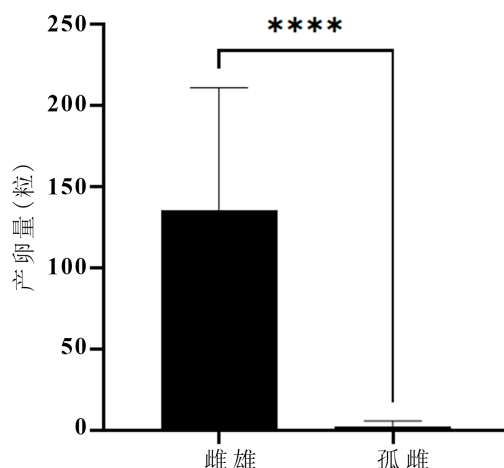


Figure 1. Difference of oviposition between female and male paired females and parthenogenetic females

图 1. 雌雄配对雌虫与孤雌产卵量差异性

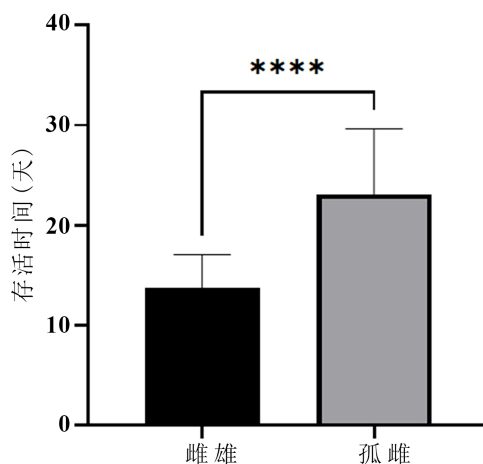


Figure 2. Differences in longevity between female and male paired females and parthenogenetic females

图 2. 雌雄配对雌虫与孤雌寿命差异性

4. 结论

对南疆三个地区的番茄潜叶蛾种群进行分析的主要结果是发现了共生菌 *Wolbachia* sp. 的存在，而没有检测到螺原体(*Spiroplasma* sp.)、杀雄菌(*Arsenophonus* sp.)、拟杆菌(*Cardinium* sp.)和立克次氏体(*Rickettsia* sp.)。在每个地区选取的用于试验的 60 只番茄潜叶蛾中，阿拉尔市所检测出的 *Wolbachia* sp. 阳性率为 66.6%，库车市所检测出的 *Wolbachia* sp. 阳性率为 11.6%，和田县所检测出的 *Wolbachia* sp. 阳性率为 20.0%，随后进行序列比对，相似度与感染 *Wolbachia* (KX146859.1、KX146854.1) 的 *Wolbachia* 内共生菌相似度达 100%。在阿拉尔地区继续进行孤雌生殖试验的结果证明，所进行试验的处女蛾虽然进行

产卵,但并未发现卵孵化。处女蛾寿命要比雌雄配对的雌性寿命更加长,而产卵量却远远不如雌雄配对的产卵数量多。

5. 讨论

对三个地区的番茄潜叶蛾种群进行分析的主要结果是发现了共生菌 *Wolbachia* sp. 的存在,但是并没有检测到螺原体(*Spiroplasma* sp.)、杀雄菌(*Arsenophonus* sp.)、拟杆菌(*Cardinium* sp.)和立克次氏体(*Rickettsia* sp.),这也与 Cagnotti 等人所研究结果一致[10]。在阿拉尔地区继续进行孤雌生殖试验时,所进行试验的处女蛾虽然进行产卵,但并未发现卵孵化。本试验结果与 Caparros Megido 等人在实验室内发现了番茄潜叶蛾可以孤雌产卵且成活率高达 39.9%的结果相矛盾[19]。结果可能表明,孤雌生殖可能是一种偶然现象,而不是一种固定的繁殖机制[20]。又或者是番茄潜叶蛾只有在面对环境胁迫时才会发生的一种生殖方式,番茄潜叶蛾孤雌生殖还需要更大样本量进行观察,具体引起孤雌生殖原因尚待深入研究。总的来说,本次孤雌试验尽管发现单性番茄潜叶蛾可以进行产卵,并且产卵量在个位数甚至可以达到十位数,但是并未发现卵孵化情况,却发现进行配对的雌性潜叶蛾寿命与未进行配对的雌性潜叶蛾寿命存在差异,本研究对潜叶蛾的生殖行为及其生态学特性的理解具有一定的科学意义。

参考文献

- [1] 张桂芬,刘万学,郭建洋,等. 重大潜在入侵害虫番茄潜叶蛾的 SS-COI 快速检测技术[J]. 生物安全学报, 2013, 22(2): 80-85.
- [2] 罗明磊,田小草,刘万学,等. 重大入侵害虫番茄潜叶蛾在 4 个烟草品种上的适合度评估[J]. 植物保护, 2022, 48(6): 162-168.
- [3] 王俊,高建诚,管辉. 番茄潜叶蛾在新疆的发生情况与防控建议[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(12): 83-84+79.
- [4] 屈春侠,唐兰兰,于忠友. 番茄潜叶蛾危害与防控[J]. 西北园艺(综合), 2021(6): 47-48.
- [5] 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.
- [6] 石朝鹏,高中强,孟璐璐,等. 山东省番茄潜叶蛾发生与绿色防控技术[J]. 山东农业科学, 2023, 55(11): 19-25.
- [7] 张治科,吴圣勇,雷仲仁. 宁夏地区新发农业入侵生物番茄潜叶蛾的发生危害及防控[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(11): 111-116.4
- [8] 尹艳琼,郑丽萍,李峰奇,等. 云南弥渡县番茄潜叶蛾的发生情况及田间防治效果[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(3): 559-566.
- [9] 李栋. 外来入侵害虫番茄潜叶蛾的生态适应性研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [10] Cagnotti, C., Conte, C., Kramar, J., et al. (2023) Molecular Detection of Reproductive Symbionts and Parthenogenesis Experiments in *Tuta absoluta* from Argentina: Facing Potential for Sustainable and Specific Pest Control Strategies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **171**, 681-690. <https://doi.org/10.1111/eea.13329>
- [11] Werren, J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, **42**, 587-609. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>
- [12] Ahmed, M.Z., Breinholt, J.W. and Kawahara, A.Y. (2016) Evidence for Common Horizontal Transmission of *Wolbachia* among Butterflies and Moths. *BMC Evolutionary Biology*, **16**, Article No. 118. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0660-x>
- [13] Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S. (1998) Phylogeny and PCR-Based Classification of *Wolbachia* Strains Using WSP Gene Sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **265**, 509-515. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>
- [14] Heddi, A., Grenier, A.M., Khatchadourian, C., et al. (1999) Four Intracellular Genomes Direct Weevil Biology: Nuclear, Mitochondrial, Principal Endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 6814-6819. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6814>
- [15] Kageyama, D., Anbutsu, H., Watada, M., et al. (2006) Prevalence of a Non-Male-Killing *Spiroplasma* in Natural Populations of *Drosophila hydei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 6667-6673. <https://doi.org/10.1128/AEM.00803-06>

-
- [16] Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., *et al.* (2008) The Diversity of Reproductive Parasites among Arthropods: *Wolbachia* Do Not Walk Alone. *BMC Biology*, **6**, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>
- [17] Zchori-Fein, E. and Perlman, S.J. (2004) Distribution of the Bacterial Symbiont *Cardinium* in Arthropods. *Molecular Ecology*, **13**, 2009-2016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02203.x>
- [18] Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., *et al.* (2005) *Rickettsia* Symbiont in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel Cellular Tropism, Effect on Host Fitness, and Interaction with the Essential Symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4069-4075. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4069-4075.2005>
- [19] Megido, C.R., Haubruge, E. and Verheggen, J.F. (2012) First Evidence of Deuterotokous Parthenogenesis in the Tomato Leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science*, **85**, 409-412. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0458-6>
- [20] Chang, C., Ting, C.T., Chang, C.H., *et al.* (2014) The Persistence of Facultative Parthenogenesis in *Drosophila albomicans*. *PLOS One*, **9**, e113275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113275>