



基于高通量测序的不同虫态洋虫内共生微生物群落分析

王长文, 房柳, 梁运江, 黄世臣, 董巍巍*

延边大学农学院, 吉林 延吉 133002

摘要:【目的】为分析不同虫态下洋虫内共生微生物菌群组成情况,以成虫和幼虫两种虫态为研究对象。【方法】通过对洋虫内共生微生物提取及高通量测序分析,获得不同样品中微生物组成结构及变化情况。【结果】不同虫态下,随着生长发育的进行,洋虫体内细菌在丰度和多样性两个方面都有很大变化,成虫中的菌群数量相对较少,多样性较幼虫也明显降低。在几种特定微生物组成上不同虫态也存在着较大的差异,成虫中,漫游球菌属和乳酸菌属为优势菌属;幼虫体内乳酸菌属为优势菌属。真菌变化不明显,孢囊线黑粉酵母菌属为其优势菌属。【结论】研究结果将为后继洋虫生物资源的研究提供相关信息,为洋虫内共生微生物资源开发与利用提供理论依据。

关键词: 洋虫, 高通量测序, 内共生微生物, 虫态

洋虫(*Martianus dermestoides*),按生物分类法属鞘翅目拟步甲科,又称“九龙虫”,是一种常见于民间的食药兼用的家养饲喂性昆虫^[1],因其既可食用,又可入药,近年来已成为研究热点之一^[2]。洋虫在免疫抗炎、保护肝脏、改善血液等方面效果显著,而大部分研究者认为其原因可能为洋虫体内有某些特殊组分,其作用机理目前尚处于研究中^[3-4],而通过药用洋虫蛀药材之生活习性,推断出洋虫体内可能存在特殊微生物功能菌种。

昆虫体内存在着大量的微生物,对昆虫生长起着至关重要的作用^[5-7]。因昆虫易受病原微生物

的侵袭,大部分研究仍集中于昆虫病原微生物及其影响。受动物共生生态理论的影响,近年来对于在昆虫体内这一特殊环境下生存的微生物的研究也丰富起来^[8-9]。研究表明,昆虫和内共生微生物之间不仅仅存在着寄生、侵害等不利关系,此两者之间的互利共生关系也十分广泛,甚至某些微生物菌群对昆虫自身的生长发育起着举足轻重的作用^[10]。栖息在昆虫体内的微生物菌群在数量和种类上均极为丰富^[11]。昆虫内部作为富于变化的特殊生境,存在共生互利关系的微生物菌群也处于动态变化中,一般的微生物分离方法操作

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”规划科研项目(JJKH20191131KJ)

*通信作者。Tel: +86-433-2435553; E-mail: wwdong@ybu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-02; 修回日期: 2019-05-15; 网络出版日期: 2019-06-06

难度很大。因此,有关昆虫内共生微生物的研究少之又少,较多的研究为社会性昆虫、农作害虫的内共生微生物的群落结构及其功能^[12-13]。不过,随着相关技术的不断完善,研究对象不再限制在类似于白蚁、蝗虫此类昆虫上,可利用的研究方法也迅速发展。

传统的微生物分离培养方法存在培养环境苛刻、操作繁琐、限制性大等缺点,而宏基因组学技术作为一项新兴技术,可直接提取样品中的总DNA进而分析,获得更为完整的微生物群落生物学信息,达到鉴定微生物基因组、分析群落结构、比较不同样品间差异的目的,具有可大量操作、限制因素少等优点^[14]。随着分子生物学、分子遗传学的不断完善,高通量测序技术作为新兴测序技术得以快速发展并广泛应用,成为常用于环境保护、特境微生物研究、医疗保健等领域的技术之一^[15]。关于昆虫中微生物菌群的研究绝大部分集中于昆虫微生物多样性、菌群结构,昆虫的不同虫态的菌群差异对比鲜见报道^[16]。本实验以不同虫态下的洋虫为研究对象,采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术研究不同虫态的洋虫样品中的群落结构并进行比较,研究结果揭示了不同虫态洋虫内共生微生物群落种类多样性、OTU 丰富度、物种总数及优势菌属。本项研究结果提高中药洋虫的药用及应用价值,为后继洋虫生物资源的研究提供相关信息,为洋虫内共生微生物资源开发与利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

昆虫源是东北林业大学生命科学学院室内昆虫分子生物学研究的实验种群。置于 30 cm×20 cm×10 cm

培养箱中,使用含水率为 70%的人工饲料(大枣 80%,人参 20%),温度 25±1 °C、相对湿度 70%–80%条件下进行人工饲养 6 个月,每批次幼虫在培养大约 15 d 后分装到洋虫培养箱中,并保持合适的幼虫、成虫密度,以达到连续饲养和维持种群稳定的目的。

TransStart FastPfu DNA Polymerase (美国 Qiagen 公司); *TruSeq™* DNA Sample Prep Kit 等测序用试剂(美国 Illumina 公司); *AxyPrepDNA* 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen Biosciences 公司), *GeneAmp®* 97001 型聚合酶链式反应(*polymcrize chain reaction*, PCR)仪(美国 ABI 公司); *QuantiFluor™-ST* 蓝色荧光定量系统(美国 Promega 公司)。

1.2 洋虫内共生微生物提取

取生长状态良好的洋虫成虫、幼虫,在厌氧操作台上去头、去翅,置于 75%酒精中 90 s,体表灭菌,无菌水淋洗后研磨,加入 PBS 缓冲溶液移至离心管中,低速离心,取出上清液,再高速离心,取下方沉淀。分别取不同虫态洋虫各 30 只,同虫态洋虫 10 只作为一组,每种虫态 3 个重复样品,共 6 个样品。

1.3 不同虫态洋虫内共生微生物细菌、真菌 PCR 扩增及文库构建

试验方法依据产品说明书使用基因组 DNA 提取试剂盒对洋虫内共生微生物进行基因组 DNA 提取,以提取的总 DNA 为模板,采用 16S rDNA V3-V4 区引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3'), 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTA AT-3')进行 PCR 扩增^[17]。使用通用引物 1737F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和 2043R (5'-GCTGCGTTCCTTCATCGATGC-3') 扩增真菌

ITS1 区域^[18]。将 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN) 回收目的条带, 使用 Qubit 荧光定量系统对回收产物进行检测定量, 等量混合不同样品 PCR 回收产物, 构建高通量测序文库, IlluminaHiSeq 2500 上机测序。

1.4 洋虫内共生微生物信息分析

根据 PE reads 之间的 Overlap 关系, 通过拼接、过滤、去除嵌合体 3 个步骤将 HiSeq 测序得到的双端序列数据拼接成优化序列, 并进行质量检验。根据不同的相似性水平, 划分操作分类单元, 聚类优化序列, 根据分类学信息通过多样性分析研究同一虫态的洋虫内共生微生物的物种多样性以及比较不同虫态(成虫、幼虫)的内共生微生物在物种多样性方面(群落组成及结构)存在的差异(具体由北京百迈客云科技有限公司协助完成)。

2 结果和分析

2.1 测序数据统计

通过统计并处理原始序列、优化序列、有效序列等阶段的数据, 进行质量评估后得到各实验组的有效序列范围为 56094–62104 条, 平均序列长度为 421–429 bp。其中, 有效序列长度范围在 410–440 bp 的序列占有有效序列总数的 96.81%。使用 QIIME 软件中的 UCLUST 对样品序列在 97% 的相似度水平下进行聚类, 进而获得细菌 OTU 个数, 在 97% 相似水平下细菌 OTU 的数量范围为 181–421, 其中成虫细菌 OTU 数量(平均 231)要比幼虫(平均 362)低并且平行样品间的相对差异较小, 由聚类分析的数据可知, 洋虫幼虫体内的特有细菌相对种类较为丰富, 而成虫内共生细菌种类明显减少。

表 1. 不同虫态洋虫样品有效序列与分类单元数量统计

Table 1. Numbers of valid sequences and OTUs in different samples

Sample	Valid sequences	AvgLen/bp	OTUs
Adult 1	59336	427	280
Adult2	61013	429	233
Adult3	61571	428	181
Larva1	58583	421	421
Larva2	56094	426	367
Larva3	58251	426	299

利用 Illumina HiSeq2500 对洋虫幼虫和成虫两种虫态共生菌中的真菌进行分析, 比较两种虫态共生菌菌群结构组成。本实验测序样品 2 组, 每组样品 3 个平行, 去除嵌合体后平均每组序列数为 73016 条, 序列平均片段长度 233 bp, 用 Usearch 软件将相似度大于 97% 的序列聚类并统计后得出各组的 OTU 数值。由图 1 可知: 洋虫成虫中真菌 OTU 为 552 种, 幼虫中真菌 OTU 为 521 种, 总共菌种为 817 种, 两种虫态下均存在的有 256 种。两种虫态中的真菌菌种丰度虽无明显差别, 但幼虫和成虫内真菌类别有着较大差别。

2.2 多样性指数分析

单样本多样性(Alpha 多样性)可以通过多种衡量指标(Chao1、Ace、Shannon、Simpson)来反映

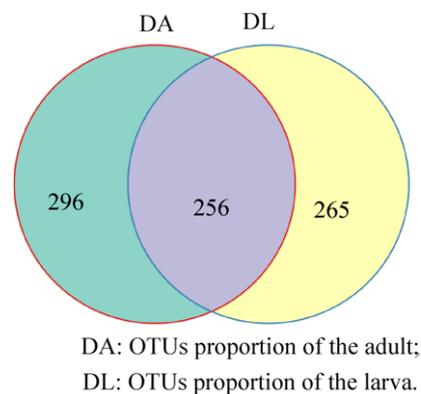


图 1. Venn 图

Figure 1. Venn diagrams.

单一样品物种丰度及物种多样性。样本文库覆盖率越高,则检出样本内物种的概率越高,因此覆盖率数值大小可以直观反映测序结果是否代表样本中微生物的实际存在现状^[19-20]。表 2 显示,成虫和幼虫样品的 OTU 覆盖率均在 0.998 以上,说明测序数据量合理,样品中近乎全部的生物学信息得以体现,可用于对菌群多样性进行分析^[21]。样品菌群丰度的主要衡量指标为 Chao1 和 ACE 指数,而 Shannon 和 Simpson 指数则用于衡量受样品菌群中物种数量和物种均匀度影响的物种多样性^[22]。相同物种丰度,物种均匀度越大,群落的物种多样性越丰富^[23]。实验结果表明,不同虫态下,洋虫内共生微生物在丰度和多样性两个方面都有很大差别。总体来说,成虫中的微生物菌群数量相对较少,多样性较幼虫也明显降低(表 2),其原因可能为随着洋虫的生长发育,内部系统逐渐完善,内共生微生物也逐渐趋近于动态平衡,而随着抵抗能力的增加,体内环境更为复杂,微生物的多样性也就相对降低^[24]。

2.3 不同分类水平上的菌群结构分析

将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比较可得到对应的物种信息,进行分类学分析,分

别在科和属水平上统计成虫和幼虫的群落结构。

由图 2 可知,洋虫成虫的细菌优势菌科为多弧菌科和肠球菌科,其丰度较高,其中多弧菌科占菌群总量的 73.46%。而洋虫幼虫中微生物菌群结构与成虫相比,菌群结构变化较大,不同样品间的差异相对较大,主要微生物为肠球菌和链球菌,丰度值较高,这两类占菌群数量的 62.14%,原因可能为幼虫仍处于活跃生长期,体内环境变化较大。两者进行比较,多弧菌科的比重变化明显,由幼虫中的 4.62% 升至成虫的 73.46%,而幼虫中的优势菌科(肠球菌科、链球菌科)的相对丰度由 62.14% 降至 20.21%。由于肠球菌科广泛存在于动植物的肠道中,因此在两种虫态下均保持较高的相对丰度。

表 2. 不同虫态洋虫样品的多样性指数

Table 2. Bacterial community diversity of different samples

Sample	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
Adult 1	294.0460	294.1710	0.3202	1.7240	0.9994
Adult 2	278.9295	279.2222	0.4247	1.2926	0.9989
Adult 3	209.2419	207.0909	0.4808	1.1661	0.9993
Larva1	424.8748	427.0241	0.1245	3.7506	0.9997
Larva2	384.3405	387.2174	0.2993	2.5208	0.9993
Larva3	305.0892	314.5455	0.3555	2.0488	0.9996

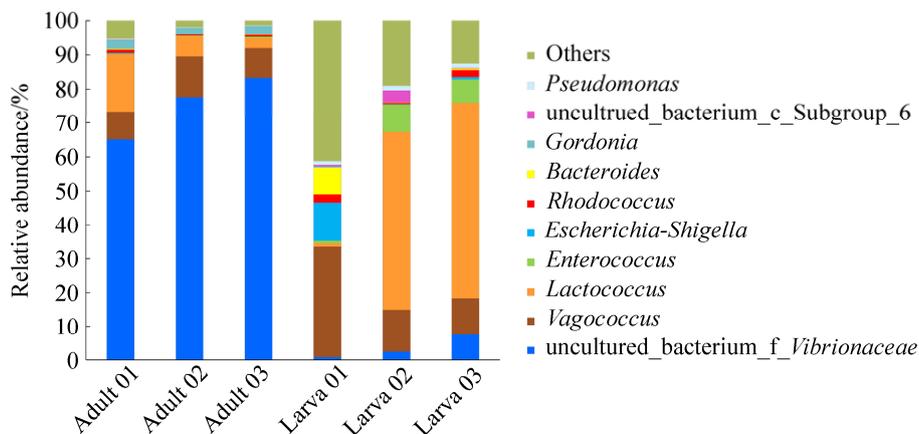


图 2. 科水平洋虫的幼虫与成虫共生菌细菌菌群结构组成

Figure 2. Bacterial community composition at family level in different groups.

洋虫成虫共生菌中, 不可培养细菌数较多, 漫游球菌属和乳酸菌属含量较高, 属优势菌属; 在幼虫体内乳酸菌属所占比例较高, 丰度值较大, 属于幼虫共生菌中的优势菌属(图 3)。随着生长发育进程, 不可培养细菌数大量增加, 原因可能为昆虫内部作为一种特殊的生存环境, 逐渐变得复杂, 而漫游球菌属和乳酸菌属在两种虫态下均为优势菌群, 或因这两属和昆虫的消化吸收有着密切关系。

洋虫内共生真菌丰度和多样性在不同虫态下没有明显变化。在门水平结构组成上, 主要子囊菌门, 个别属于担子菌门、被孢霉亚门等。在属

水平上主要为 *Cystofilobasidium_macerans*、*Mortierella_alpina*、*Tetracladium_marchalianum*、*Guehomyces_pullulans* 等菌属(图 4、图 5)。研究发现, 洋虫(幼虫、成虫)真菌中孢囊线黑粉酵母菌属为其优势菌属。由图可看出有大量未被分类物种存在。

2.4 菌群样本组成分析

热图是以颜色梯度来代表数据矩阵中数值的大小并通过对类型和数量相似的样品和菌种进行聚类的直观表现形式^[25-26]。根据丰度的不同, 利用颜色差异将样品物种进行分类, 进而显示多个样品菌群结构的相似点和不同点^[27]。根据每个样品的物种组成和相对丰度在不同水平上进行物

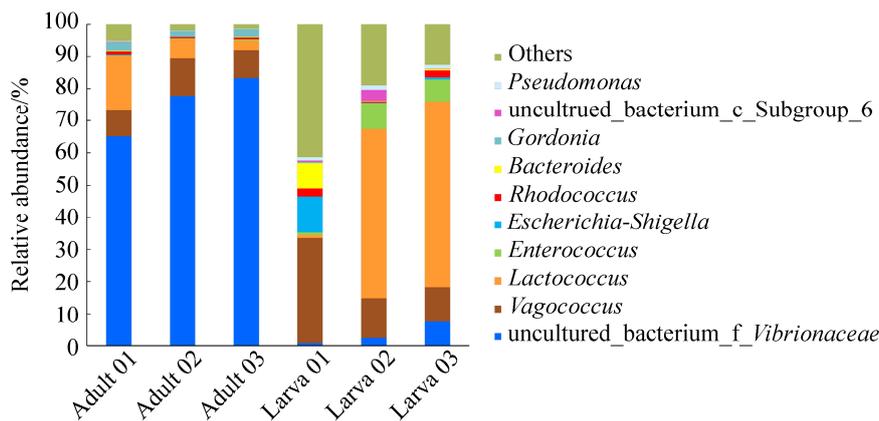


图 3. 属水平洋虫的幼虫与成虫共生菌细菌菌群结构组成

Figure 3. Bacterial community composition at genus level in different groups.

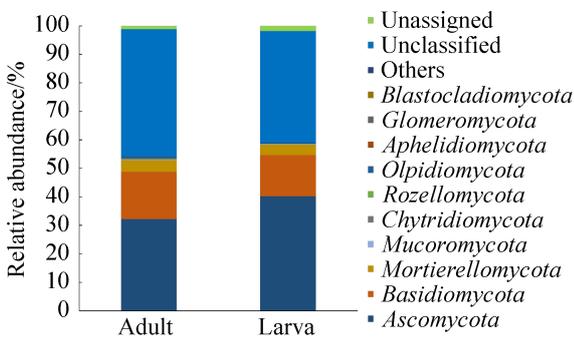


图 4. 不同虫态洋虫共生菌中真菌菌群结构组成(门水平)
Figure 4. Fungal community composition at phylum level in different groups.

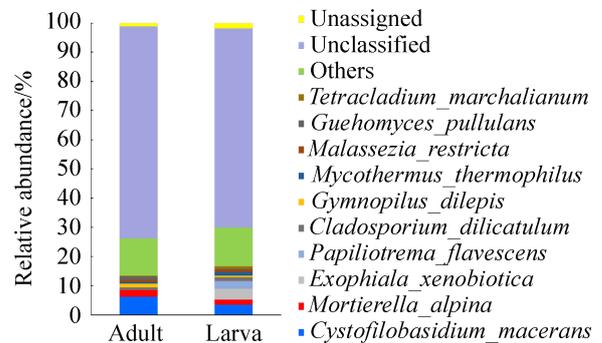


图 5. 不同虫态洋虫共生菌中真菌菌群结构组成(属水平)
Figure 5. Fungal community composition at genus level in different groups.

种热图聚类分析, 颜色代表物种丰度; 左侧聚类树表示各物种在不同样品中所占比例的近似情况^[28], 同一行中颜色深浅, 表示该物种在各样品中的丰度差异; 上方聚类体现各样品的相似度, 左方体现物种间的相似度, 结果如图 6 所示。分析发现, 与成虫样品不同, 不同幼虫样品菌群结构相似性较差, 说明幼虫体内环境的变化显著, 细菌菌群结构变化也相对较大, 这一点和物种分析结果一致。随着生长发育的进行, 菌群的丰度值明显降低, 优势菌种也明显变化。

2.5 样品主成分分析

主成分分析是一种分析和简化数据集的技术, 通过计算方差, 将不同样品的差异直观展现在平面坐标系中^[29]。研究各样品的 OTU 组成结构, 可以通过分析各样品的距离来推测各样品的相似和差异程度, 两个样品距离越远, 说明这两个样品的结构差异越大^[30-31]。不同洋虫样品 PCA 结果如图 7。

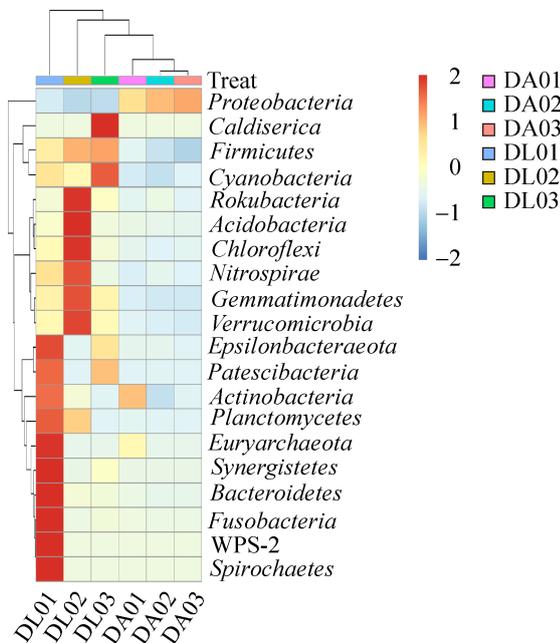


图 6. 不同洋虫样品微生物丰度聚类热图(门水平)

Figure 6. Microbial community heatmap analysis at phylum level for different groups.

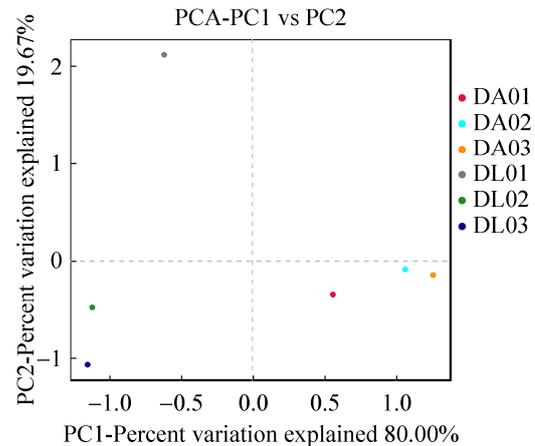


图 7. 不同洋虫样品 PCA

Figure 7. PCA plots for different groups.

对于 PC1, 幼虫和成虫样本距离较远, 而幼虫之间的变化不明显; 而对于 PC2, 幼虫不同样品间存在较大差异, 成虫中在 PC1、PC2 两个主成分水平上变化均不明显。说明成虫体内微生物的群落结构更为稳定, 而幼虫内共生微生物仍处在明显变化过程中, 进一步说明在这两个主成分水平上不同虫态下的菌群特征明显不同, 在特定的某些微生物丰度上也有着很大的差异。

3 结论和展望

本研究以不同虫态下洋虫为研究对象, 采用 Illumina 高通量测序技术分析各样品中菌群组成及变化情况。结果显示, 不同虫态下, 随着生长发育的进行, 洋虫内共生细菌在丰度和多样性两个方面都有很大变化, 菌群的丰度值明显降低, 优势菌种也发生改变, 由洋虫幼虫中乳酸菌菌属转变为成虫中的漫游球菌属和乳酸菌菌属。洋虫内共生微生物真菌丰度和多样性在不同虫态下没有明显变化, 但真菌类型存在很大差别, 而子囊菌门在不同虫态下丰度值均处于较高水平。

近年来, 随着科学技术的不断完善, 高通量

测序技术也被广泛应用起来,这对于生物资源利用开发有着深远意义。药用昆虫作为典型生物资源,在医疗、保健、饲料等领域都备受关注,而因其体内环境的特殊性,栖息在其中的微生物菌群也有着重要研究意义。本研究说明洋虫内共生微生物菌种随着洋虫的生长发育不断变化,对研究洋虫消化转化中药材有着重要意义,在进一步开发药用洋虫资源的过程中应密切关注。

值得一提的是,无论是对细菌还是真菌的研究分析,不可培养的和未被分类的菌种占一定的比例,由此可知,洋虫体内共生菌是庞大的动态微生物寄居场所,是有待开发宝贵而丰富的生物资源。

参考文献

- [1] 周蕊. 洋虫生物生态学特性及营养价值的研究. 西南大学硕士学位论文, 2006.
- [2] Si WT, Shao HM. Research progress of breeding and medicinal value of *Martianus dermestoides* chev. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 33(8): 1922–1924. (in Chinese)
司文涛, 邵宏敏. 动物药洋虫饲养及药用价值研究进展. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1922–1924.
- [3] Yan SC, Wang L, Li Q, Fu Y. Anti-senile effects of water extraction of *Martianus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) feeding different foods on aging mice. *Acta Entomologica Sinica*, 2009, 52(7): 820–824. (in Chinese)
严善春, 王雷, 李勍, 付勇. 基于不同饲料的洋虫水提液对小鼠的抗衰老作用. 昆虫学报, 2009, 52(7): 820–824.
- [4] Wang CY, Feng Y, Chen XM. The complete mitochondrial genome of a medicinal insect *Martianus dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 2016, 27(3): 1627–1628.
- [5] Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 2005, 8(12): 1291–1298.
- [6] Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(46): 20051–20056.
- [7] Hillman ET, Lu H, Yao TM, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments*, 2017, 32(4): 300–313.
- [8] Dillon R, Charnley K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 2002, 153(8): 503–509.
- [9] Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(35): 12974–12979.
- [10] Yang H, Peng JX, Liu KY, Hong HZ. Diversity and function of symbiotic microbes in the gut of lower termites. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 496–499. (in Chinese)
杨红, 彭建新, 刘凯于, 洪华珠. 低等白蚁肠道共生微生物的多样性及其功能. 微生物学报, 2006, 46(3): 496–499.
- [11] Cheng Q, Aksoy S. Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes *in vivo* in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Molecular Biology*, 1999, 8(1): 125–132.
- [12] Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell*, 2009, 41(3): 151–168.
- [13] Liu YS, Ye BH, Lv F, Zheng JF. Study on the primary identification of intestinal bacteria in *Clavis bilineata*. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2006, 37(3): 345–348, 353. (in Chinese)
刘玉升, 叶保华, 吕飞, 郑继法. 豆天蛾幼虫肠道细菌分离及初步鉴定研究. 东农业大学学报(自然科学版), 2006, 37(3): 345–348, 353.
- [14] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245–R249.
- [15] Miget RJ. Microbiology of crustacean processing: shrimp, crawfish, and prawns//Ward DR, Hackney C. Microbiology of Marine Food Products. Boston, MA: Springer, 1991: 66–87.
- [16] Krakova L, Šoltys K, Budiš J, Grivalský T, Ďuriš F, Pangallo D, Szemes T. Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. *Extremophiles*, 2016, 20(5): 795–808.
- [17] Dong WW, Xuan FL, Zhong FL, Jiang J, Wu SQ, Li DH, Quan LH. Comparative analysis of the rats' gut microbiota composition in animals with different ginsenosides metabolizing activity. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 2017, 65(2): 327–337.
- [18] Liu JL, Sun M, Cao XH, Zhang X, Li JY. Analysis of fungal diversity in homemade sourdough starters using high-throughput sequencing. *Food Science*, 2018, 39(22): 186–194. (in Chinese)
刘建利, 孙敏, 曹晓虹, 张琇, 李靖宇. 利用高通量测序技术分析民间面引子中的真菌多样性. *食品科学*, 2018, 39(22): 186–194.
- [19] Rahimi E, Shakerian A, Raissy M. Prevalence of *Listeria* species in fresh and frozen fish and shrimp in Iran. *Annals of microbiology*, 2012, 62(1): 37–40.
- [20] Liu L, Kong BH. Optimized effects of temperature and modified atmosphere packaging on listeria monocytogenes of chilled pork. *Food Science*, 2008, 29(1): 334–337. (in Chinese)
刘柳, 孔保华. 温度及气调包装对冷却猪肉中单核细胞增生性李斯特菌生长的影响. *食品科学*, 2008, 29(1): 334–337.
- [21] Li KK, Zhuo C, Teng CY, Yu SM, Wang X, Hu Y, Ren GM, Yu M, Qu JJ. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 904–912.
- [22] Wen CQ, He YY, Xue M, Liang HF, Dong JD. Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 130–142. (in Chinese)
温崇庆, 何瑶瑶, 薛明, 梁华芳, 董俊德. 高通量测序分析DNA提取引起的对虾肠道菌群结构偏差. *微生物学报*, 2016, 56(1): 130–142.
- [23] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [24] Zhou R, Chen L, Zhou Q, Yang YX. Effects of feed on the growth and development of *Palembus dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleptera: Tenebrionidae). *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science)*, 2005, 27(6): 861–863. (in Chinese)
周蕊, 陈力, 周琴, 杨颖雪. 不同饲料对洋虫幼虫生长发育的影响. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(6): 861–863.
- [25] Liu JF, Liu HY, Qi FS, Li LN. Application of nano-TiO₂/chitosan composite preservative on *Penaeus vannamei* preservation. *Food Science and Technology*, 2014, 39(2): 245–249. (in Chinese)
刘金昉, 刘红英, 齐凤生, 李丽娜. 纳米TiO₂/壳聚糖复合保鲜剂在南美白对虾保鲜中的应用. *食品科技*, 2014, 39(2): 245–249.
- [26] Jiang YH, Yao L, Li FL, Guo YY, Zhu WJ, Wang LZ. Analysis for bacterial flora structure of frozen Antarctic krill *Euphausia superba* by high-throughput sequencing technique. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(7): 2840–2845. (in Chinese)
江艳华, 姚琳, 李凤铃, 郭莹莹, 朱文嘉, 王联珠. 基于高通量测序的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构分析. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(7): 2840–2845.
- [27] 王江博. 一株莫拉氏菌新种的分离鉴定与特性研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
- [28] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [29] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [30] Friedman J, Alm EJ. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Computational Biology*, 2012, 8(9): e1002687.
- [31] Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 2014, 30(21): 3123–3124.

Microbial diversity in *Martianus dermestoides* at different stages based on high-throughput sequencing technology

Changwen Wang, Liu Fang, Yunjiang Liang, Shichen Huang, Weiwei Dong*

Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] To analyze the composition of endosymbiosis microbes of *Martianus dermestoides* at different stages, we took adult and larva as the research objects. [Methods] By the extraction of endosymbiosis microbes of *Martianus dermestoides* and high-throughput sequencing analysis, we obtained the composition and changes of microflora in different samples. [Results] At different insect stages, the endosymbiosis microbes abundance and diversity of *Martianus dermestoides* changed greatly with the development of the insect, the number of bacteria in the adult was relatively small, and the diversity was significantly lower than that in the larva. Different insect states had also significant differences in the composition of several specific microorganisms. Among the adult, *Vagococcus* and *Lactobacillus* were dominant bacterial genus; *Lactobacillus* in larvae was the dominant bacterial genus. The change of fungi was not obvious, and *Saccharomyces* spp. was dominant. [Conclusion] Our findings provide related information of biotic resources of *Martianus dermestoides*. Meanwhile, the result can also furnish the theoretical basis for the development and utilization of *Martianus dermestoides* endosymbiosis microorganism resources.

Keywords: *Martianus dermestoides*, high-throughput sequencing, endosymbiosis microbes, insect states

(本文责编: 李磊)

Supported by the 13th Five-Year Plan for Scientific Research of Jilin Provincial Department of Education (JJKH20191131KJ)

*Corresponding author. Tel: +86-433-2435553; E-mail: wwdong@ybu.edu.cn

Received: 2 April 2019; Revised: 15 May 2019; Published online: 6 June 2019

董巍巍, 延边大学农学院讲师, 硕士研究生导师, 分析化学博士, 主要从事昆虫肠道微生物资源开发与利用等研究工作。主持吉林省教育厅项目 1 项; 吉林省科技厅项目 1 项, 参与国家自然科学基金 5 项。“水环境综合治理应用及探讨”荣获吉林省自然科学学术成果奖; 指导学生参加全国大学生生命科学竞赛荣获三等奖, 吉林省大学生生命科学竞赛荣获一等奖。以第一作者在 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*、*Journal of Ginseng Research* 等期刊上发表 SCI 论文 3 篇, 省级以上期刊论文 10 余篇, 申请实用新型专利 1 项。

