



## 松墨天牛成虫室内外种群肠道细菌的多样性及功能分析

陈宏健<sup>1,2</sup>, 周杨<sup>1,2</sup>, 夏小洪<sup>1,2</sup>, 赵欣怡<sup>1,2</sup>, 乔恒<sup>1,2</sup>, 谈家金<sup>1,2</sup>, 郝德君<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037

<sup>2</sup>南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037

**摘要:** 【目的】为明确松墨天牛 *Monochamus alternatus* 成虫中、后肠细菌群落结构, 探索肠道细菌的潜在功能。【方法】分别提取室外和室内饲养的松墨天牛成虫各15头(室内和室外各15个中肠、15个后肠)的肠道DNA, 利用二代测序技术对松墨天牛成虫肠道细菌的16S rDNA V3–V4区序列进行测序, 统计操作分类单元(OTUs)数量, 分析物种组成、Alpha多样性和Beta多样性; 采用PICRUSt软件预测肠道细菌的功能。【结果】共获得544180条高质量序列, 在97%相似度下将其聚类为615个OTUs, 总共注释到22个门、48个纲、112个目、172个科、285个属和408个种。室内种群的OTUs数量多于室外种群, 室内外种群的OTUs种类存在差异性。同一种群的中、后肠之间差异不明显。变形菌门 *Proteobacteria* 为室内外松墨天牛肠道细菌的最优势门; 肠杆菌属 *Enterobacter* 为室外种群肠道细菌和室内种群后肠细菌的最优势属, 沙雷氏菌属 *Serratia* 为室内种群中肠的最优势属。Alpha多样性结果表明松墨天牛成虫室内种群肠道菌群的丰度显著高于室外种群; Beta多样性结果显示室外种群肠道菌群均一性和稳定性比室内种群好。室外和室内种群的中肠与后肠之间在菌群丰度和多样性上均无显著差异。功能预测结果表明, 室内外松墨天牛成虫肠道菌群中代谢通路的丰度最高, 其中以糖类代谢和氨基酸代谢为主, 还有降解外源化学物质、萜类和聚酮类化合物及其他次生代谢物质的能力。不同种群、不同肠段之间的功能丰度均无显著差异。【结论】明确了取食不同食料的松墨天牛成虫中、后肠的细菌群落结构及差异, 了解了肠道细菌的潜在作用, 为进一步探究松墨天牛肠道共生菌的功能提供了理论基础。

**关键词:** 松墨天牛, 成虫, 肠道细菌, 群落结构, 功能预测

松墨天牛 (*Monochamus alternatus*) 属于鞘翅目 (Coleoptera) 天牛科 (Cerambycidae), 是我国松科植物重要蛀干害虫, 也是松材线虫病扩散的主

要媒介昆虫<sup>[1-3]</sup>。该害虫在野外以幼虫钻蛀取食生长衰弱木的韧皮部和木质部, 成虫取食 1–2 年生枝条<sup>[4]</sup>。为了对松墨天牛进行深入的研究, 国

基金项目: 国家自然科学基金(31470650); 国家重点研发计划(2018YFC120040)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-25-85428583; E-mail: djhao@njfu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-19; 修回日期: 2020-07-13; 网络出版日期: 2021-02-24

内外已经掌握了松墨天牛的人工饲养方法，同时配制了多种适宜松墨天牛生长发育的半人工饲料<sup>[5-7]</sup>。

昆虫的肠道大致分为前肠、中肠和后肠 3 个部分，其中又以中肠和后肠作为最主要的消化器官，肠道内部栖居着大量的微生物，能够影响宿主昆虫的生长发育、生理代谢、生殖和免疫等生命活动<sup>[8-11]</sup>。由于中、后肠的微生态环境存在差异，因而会影响不同肠段微生物的群落结构<sup>[12]</sup>。昆虫肠道微生物群落的形成高度依赖于饮食，取食不同食料或不同生境中生长的昆虫，其肠道微生物的种类和数量会发生变化，优势菌群也可能随之改变<sup>[13-17]</sup>。

松墨天牛成虫在取食健康枝条的时候，也是从植物中获取生长发育所需营养物质的一个过程。然而，树木中的葡萄糖是以纤维素、半纤维素、葡聚糖和果胶等复杂的多糖聚合物存在，氮素含量也相对不足，植物细胞壁蛋白质与木质素和纤维素形成结合蛋白而难以被直接利用<sup>[18]</sup>，因此，蛀干昆虫进化出利用肠道共生细菌产生纤维素或半纤维素酶<sup>[19]</sup>，或者提高宿主昆虫体内相关消化酶活性<sup>[20]</sup>进而分解木质纤维素获得所需的葡萄糖。同时，萜类化合物是松属植物重要的组成性和诱导性化学防御物质<sup>[21]</sup>，蛀干害虫可以利用肠道细菌降解针叶树萜类物质<sup>[22-23]</sup>，以提高昆虫对寄主的适应性。

国外已有学者研究自然取食和人工饲养条件下松墨天牛成虫中肠、后肠细菌群落的组成<sup>[7]</sup>，但是由于国内松墨天牛成虫在室外取食的松树种类不同，人工饲料的配方也有差异，可能会形成不同的肠道菌群。因此，国内松墨天牛成虫肠道菌群组成的研究仍很重要，并且松墨天牛成虫

肠道细菌的功能尚未见报道。本研究选择从林间马尾松木段中羽化的松墨天牛成虫和室内人工饲料饲养的松墨天牛成虫为研究对象，研究 2 个种群成虫中、后肠不同肠段的细菌群落结构，进而分析这些菌群的潜在功能，为进一步揭示肠道细菌在不同食料、不同肠段中的组成变化以及帮助宿主昆虫获取营养、克服寄主植物化学防御的作用机制提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试虫源

松墨天牛成虫室外种群：将江苏省镇江市丹徒区感染松材线虫病死亡的马尾松砍伐后，锯成 2 m 的木段，放入人工自制的不锈钢网笼内(长×宽×高=2.5 m×2.5 m×2.0 m)，每天上午 8 时检查木段中羽化的天牛成虫，一旦发现羽化的成虫，及时带回室内，体表消毒后置于-80 °C 冰箱中冷冻，备用。

松墨天牛成虫室内种群：将网笼内羽化的天牛，带回室内后除了进行上述直接处理冷冻后，一部分天牛成虫放入养虫笼(长×宽×高=2.5 m×2.5 m×2.0 m)，提供 1-2 年生马尾松枝条供其补充营养，2 周后，将 5 对雌雄成虫置于相同的养虫笼内配对，提供长 25 cm、直径 7-10 cm 的马尾松木段供其产卵，定期收集卵粒并转移至半人工饲料上，参考陈瑞旭等方法(2017)进行人工饲养。将羽化的松墨天牛成虫体表消毒后置于-80 °C 冰箱中冷冻，备用。每份半人工饲料的配方为马尾松木屑 100 g、琼脂 40 g、蔗糖 20 g、酵母粉 12.5 g、安息香酸钠 2 g、山梨酸钾 1 g、0.5 mol/L 的硫酸 10 mL、麦胚粉 25g、胆固醇 1.5 g、抗坏血酸 4 g、酪蛋白 20 g、氯化胆碱 1 g、

无菌水 800 mL, 饲料使用前需经 121 °C 湿热灭菌 20 min。

## 1.2 松墨天牛成虫肠道分离

取健康的室内外种群松墨天牛成虫各 15 头, 用 75%乙醇体表消毒 1 min, 再用无菌水冲洗 2 次。无菌条件下进行解剖, 取出完整肠道, 分离中肠和后肠。不同种群成虫的中肠和后肠分别置于装有 0.5 mL PBS 缓冲液的 1.5 mL 离心管中, 每管 5 头成虫, 每个肠段 3 管, 室内外种群共 4 个肠段, 总计 12 管肠道样本用于提取肠道细菌 DNA。

## 1.3 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 CTAB 法<sup>[24-25]</sup>提取肠道细菌总 DNA, 利用 Nanodrop 2000C (Thermo Scientific) 评估 DNA 浓度, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度。以提取的细菌总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 的 V3-V4 区引物进行 PCR 扩增, 引物为 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')。PCR 反应体系 (30  $\mu$ L): 2 $\times$ Phusion Master Mix 15  $\mu$ L, 2  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1.5  $\mu$ L, DNA 模板 10 ng, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 5 min, PCR 仪采用 Bio-Rad T100。使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2%琼脂糖电泳检测。

## 1.4 文库构建和高通量测序

采用 NEB Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA) 试剂盒完成文库的构

建, 具体步骤: (1) 连接“Y”字形接头; (2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; (4) 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。经过 Qubit 定量和文库检测合格后, 利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行双端测序。

## 1.5 序列数据分析

原始序列数据使用 Trimmomatic 软件质控, FLASH 软件<sup>[26]</sup>进行拼接。拼接后的序列用 USEARCH 软件 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>) 进行 OTU 聚类<sup>[27]</sup>。再利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释<sup>[28]</sup>, 最后利用 R 软件 (version 3.5.1) 分别在门和属分类水平上统计各样本的群落组成及物种丰度情况, 同时绘制 Venn 图统计样本的 OTU 组成相似性及重叠情况。

采用 Alpha 多样性分析反映微生物群落的丰富度和多样性, 用 mothur (version v.1.30.1 [http://www.mothur.org/wiki/Schloss\\_SOP#Alpha\\_diversity](http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)) 指数分析<sup>[29]</sup>计算各样本的菌群丰富度 (Ace 和 Chao 指数) 以及菌群多样性 (Shannon 和 Simpson 指数), 并根据 Shannon 指数绘制稀释性曲线。数据采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, 使用 Tukey HSD 或 Tamhane's T2 进行多重比较。采用 Beta 多样性分析研究不同样本菌群结构的相似性或差异关系, 用 Qiime 计算 Beta 多样性距离矩阵, 根据距离矩阵进行层级聚类分析, 使用 UPGMA 算法和 R 软件 (version 3.5.1) 构建样本层级聚类树。

## 1.6 肠道菌群功能分析

采用 PICRUST 软件预测室内外松墨天牛成虫肠道菌群的功能<sup>[30]</sup>。首先对 OTU 丰度表进行标准化, 去除 16S rRNA marker gene 在物种基因

组中的拷贝数目的影响；然后根据每个 OTU 对应的 greengene ID 进行 KEGG 功能注释，获得 OTU 在各功能水平的注释信息及其在不同样本中的丰度信息。数据采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析，使用 Tukey HSD 或 Tamhane's T2 进行多重比较。

## 2 结果和分析

### 2.1 室内外松墨天牛成虫肠道细菌 16S rDNA 序列拼接和组装

从松墨天牛成虫室内外种群的 12 个肠段样本中共获得 638141 条细菌 16S rDNA 原始序列读数，经过质量过滤和去除嵌合体后，得到 544180 条高质量序列，每条序列平均长度为 419.2 bp。按照最小样本序列数进行抽平，在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 615 个 OTUs，总共注释到 22 个门、48 个纲、112 个目、172 个科、285 个属和 408 个种。

### 2.2 室内外松墨天牛成虫中、后肠细菌群落结构分析

结果如图 1 所示，松墨天牛成虫室外种群肠道的 OTU 数量远少于室内松墨天牛成虫。室外种群共有 197 个 OTUs，其中中肠有 170 个，后肠有 162 个；室内种群共有 519 个 OTUs，其中中肠有 436 个，后肠有 438 个。两个种群各自的中肠与后肠的 OTU 数量之间无显著差异。松墨天牛室内外两个种群的成虫共有相同的 OTUs 101 个，其中松墨天牛室外种群成虫中肠和室内种群成虫中肠共有相同的 OTUs 58 个，室外种群成虫后肠和室内成虫后肠共有相同的 OTUs 72 个；室外种群成虫中肠和后肠共有相同的 OTUs

135 个。室内种群成虫中肠和后肠共有相同的 OTUs 355 个。表明松墨天牛室内种群与室外种群成虫肠道的细菌群落组成存在较大差异，室内种群比室外种群的菌群丰富；无论室内种群还是室外种群，其成虫中肠和后肠的细菌群落组成具有相似性，并且丰度相当。

由图 2-A 可以看出，在门水平上，松墨天牛室内外种群成虫肠道菌群的优势门为变形菌门 (*Proteobacteria*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*)，其中变形菌门在室内种群成虫肠道中表现出更大的优势。这 2 个优势门在不同样本中所占比例不同，变形菌门在室外种群成虫的中、后肠与室内种群成虫的中、后肠中分别为 93.26%、76.85%、98.95%、99.21%，为绝对优势类群；厚壁菌门在

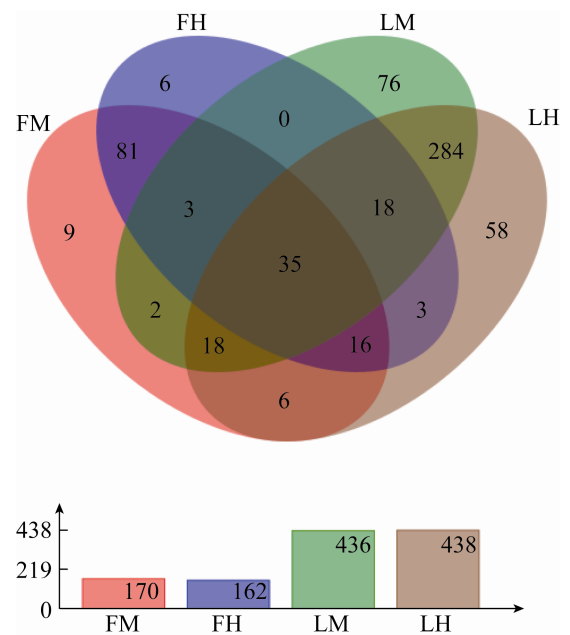


图 1. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌 OTUs 的韦恩图

Figure 1. Venn diagram of OTUs of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*. FM: outdoor midgut; FH: outdoor hindgut; LM: indoor midgut; LH: indoor hindgut.

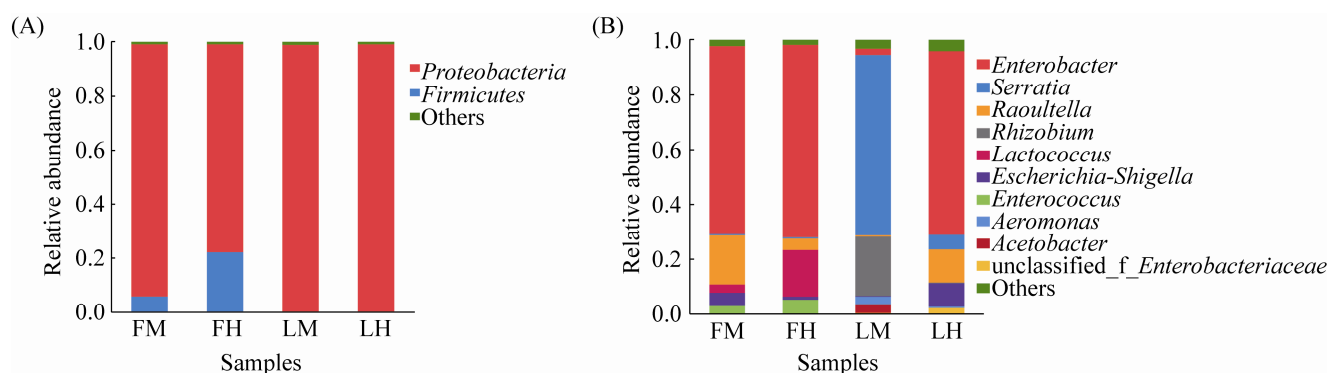


图 2. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌优势门(A)和属(B)的相对丰度

Figure 2. Relative abundance of dominant phyla (A) and genera (B) of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*.

这些样本中的占比分别为 5.97%、22.35%、0.10%、0.06%。剩余占比较少量的其他细菌分别为 0.77%、0.80%、0.95%、0.73%。

由图 2-B 可以看出, 在属水平上, 丰度排序前 10 名的优势属在室外种群成虫的中、后肠与室内种群成虫的中、后肠中所占比例分别为肠杆菌属 *Enterobacter* (68.60% : 70.21% : 2.34% : 67.08%)、沙雷氏菌属 *Serratia* (0.46% : 0.45% : 65.93% : 5.32%)、拉乌尔菌属 *Raoultella* (17.95% : 4.32% : 0.49% : 12.12%)、根瘤菌属 *Rhizobium* (0.00% : 21.47% : 0.10%)、乳球菌属 *Lactococcus* (3.04% : 16.99% : 0.00% : 0.00%)、埃希氏-志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella* (4.87% : 0.99% : 0.28% : 8.74%)、肠球菌属 *Enterococcus* (2.90% : 5.36% : 0.00% : 0.00%)、气单胞菌属 *Aeromonas* (0.02% : 0.00% : 2.79% : 0.46%)、醋杆菌属 *Acetobacter* (0.00% : 0.00% : 3.19% : 0.03%)和肠杆菌科未分类属 *unclassified\_f\_Enterobacteriaceae* (0.13% : 0.10% : 0.54% : 2.25%)。表明松墨天牛室外种群与室内种群成虫肠道的部分优势属种类不同, 且同一优势属所占比例也不同; 不同肠

段之间的优势属比例存在差异。

### 2.3 松墨天牛成虫中、后肠细菌多样性分析

由图 3 可知, 全部样本基于 Shannon 指数的稀释性曲线趋于平缓, 增加数据量产生的新 OTU 很少, 说明测序数据量合理, 测序达到足够深度。通过比较松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌 Alpha 多样性的 Ace 指数、Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数(表 1), 发现室外种群成虫肠

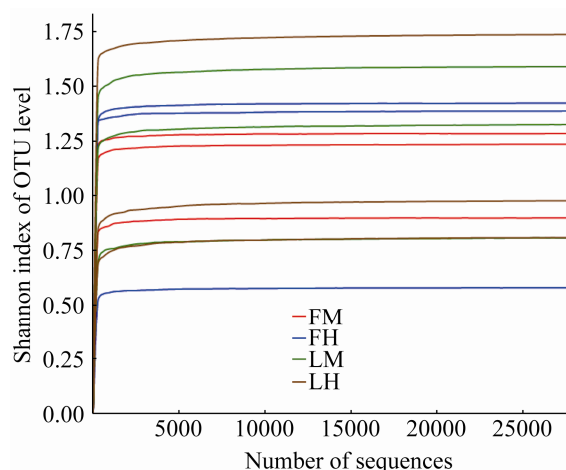


图 3. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌香农指数稀释曲线

Figure 3. Rarefaction curve of Shannon index of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*.

表 1. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌 Alpha 多样性指数

Table 1. Alpha diversity indices of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*

Sample	Ace	Chao	Shannon	Simpson
Outdoor midgut	159.16±21.77a	161.04±19.09a	1.14±0.21a	0.49±0.13a
Outdoor hindgut	156.90±10.11a	156.79±14.79a	1.13±0.48a	0.49±0.27a
Indoor midgut	480.79±102.99ab	416.05±35.79b	1.24±0.40a	0.51±0.22a
Indoor hindgut	457.73±25.20b	424.58±16.15b	1.17±0.35a	0.57±0.28a

Data in the table are Mean±SD, different lowercase letters after each column of data indicate significant difference in the alpha diversity index of bacteria among different samples ( $P < 0.05$ , SPSS One-way ANOVA).

道菌群的 Ace 与 Chao 指数均低于室内种群成虫肠道；室外种群与室内种群成虫肠道菌群的 Shannon 与 Simpson 指数之间无显著性差异；室外种群成虫的中肠与后肠，室内种群成虫的中肠与后肠之间在菌群丰度和多样性上均无显著差异。

通过构建 Beta 多样性的样本层级聚类树，探索不同分组样本间菌群组成的相似性或差异性。

本研究采用 unweighted UniFrac 的距离算法，同时考虑物种间进化关系和物种是否在样本中存在。结果如图 4 所示，可知室外种群与室内种群成虫肠道样本各自聚成一簇，相互之间无交叉，说明 2 个种群成虫的肠道细菌群落组成存在差异。室外种群成虫的中肠与后肠样本之间相互交叉，室内种群成虫的中肠与后肠样本之间亦是如此，说

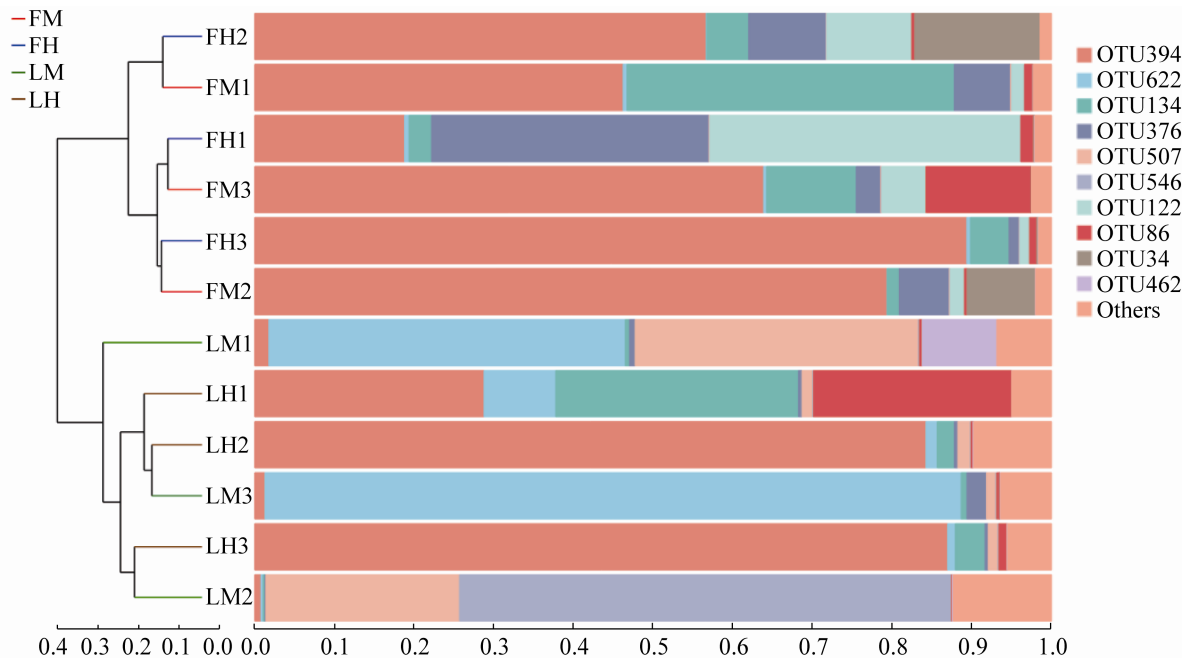


图 4. 室内外松墨天牛成虫中、后肠细菌层级聚类树

Figure 4. Hierarchical clustering tree of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*.

明 2 个种群成虫的中肠与后肠在菌群组成上较相近。比较 2 个种群成虫肠道主要的 OTU 组成发现, 室外种群成虫肠道样本的菌群均一性要优于室内种群, 表明室外种群成虫肠道菌群的组成更稳定。

#### 2.4 松墨天牛成虫肠道菌群功能分析

为探究松墨天牛室内外种群成虫肠道菌群的潜在功能, 通过 PICRUST 预测不同样本菌群在 KEGG 第一、二级通路水平上的丰度。结果如表 2 所示, 可知松墨天牛 2 个种群成虫中、后肠的细菌群落中均注释到 6 种 KEGG 一级功能通路, 分别为代谢(43.23%)、环境信息处理(21.52%)、遗传信息处理(14.06%)、细胞过程(3.56%)、人类疾病(1.03%)和组织系统(0.45%)。其中代谢功能通路的丰度占比接近所有一级通路丰度的一半, 表明 2 个成虫的肠道菌群主要行使代谢各种物质的功能。除此以外, 代谢功能的丰度在室外种群与室内种群成虫肠道样本之间未表现出显著差异, 同时在中肠与后肠

2 个肠段样本之间的差异也不显著。在其他 KEGG 一级功能通路上, 所有样本的丰度之间均无显著性差异。

对松墨天牛室内外种群成虫肠道菌群代谢通路里的二级通路进行映射注释, 共发现 12 种二级代谢功能通路(表 3)。这些二级通路对应的功能名称及其在全部样本中的占比分别为糖类代谢(24.14%)、氨基酸代谢(19.01%)、能量代谢(10.79%)、辅助因子和维生素代谢(8.73%)、脂质代谢(6.61%)、核苷酸代谢(6.50%)、外源化学物质生物降解与代谢(5.88%)、聚糖生物合成与代谢(5.06%)、酶家族(4.51%)、其他氨基酸代谢(3.89%)、萜类和聚酮类化合物代谢(3.32%)及其他次生代谢产物生物合成(1.56%)。由此可知, 2 个种群成虫肠道菌群主要参与糖类和氨基酸的代谢, 同时少部分参与降解外源化学物质、萜类和聚酮类化合物。这些功能的丰度在种群间和肠段间均无显著性差异。

表 2. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌的 KEGG 一级通路丰度

Table 2. KEGG level 1 pathway abundance of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*

Pathway name	Outdoor midgut	Outdoor hindgut	Indoor midgut	Indoor hindgut
Metabolism	12401305±1389759a	17757599±9895476a	12463332±6305946a	10153094±839320a
Environmental information processing	6120484±741717a	8666210±4740440a	6471449±3234407a	4976935±367915a
Unclassified	4799375±503720a	6669713±3549445a	4009493±1296600a	4028980±329745a
Genetic information processing	4187860±403752a	5775337±2928125a	3616539±1120312a	3542418±273549a
Cellular processes	1010093±44251a	938872±74649a	1146470±676850a	1057070±82804a
Human diseases	291732±27469a	379807±172919a	319782±222239a	254382±22951a
Organismal systems	116328±12393a	165336±91382a	162464±131240a	98734±9243a
None	44535±4092a	55810±22755a	45295±27155a	40054±3853a

Data in the table are Mean±Sd, different lowercase letters after each row of data indicate significant difference in the KEGG level 1 pathway abundance of bacteria among different samples ( $P < 0.05$ , SPSS One-way ANOVA).

表 3. 松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌的 KEGG 二级通路(代谢通路)丰度

Table 3. KEGG level 2 pathway (metabolism pathway) abundance of bacteria in the midgut, hindgut of the adult of *M. alternatus*

Pathway name	Outdoor midgut	Outdoor hindgut	Indoor midgut	Indoor hindgut
Carbohydrate metabolism	3088861±383200a	4547472±2648884a	2749950±1163724a	2434166±202324a
Amino acid metabolism	2308328±257993a	3332755±1898076a	2483234±1362195a	1901427±163224a
Energy metabolism	1377037±149385a	1894696±966210a	1262033±505856a	1143221±95101a
Metabolism of cofactors and vitamins	1114979±118356a	1542860±817751a	1010957±367609a	928575±71060a
Lipid metabolism	782971±85960a	1114780±619423a	925025±614068a	653966±58089a
Nucleotide metabolism	815771±75551a	1141440±589317a	779911±325098a	685448±50839a
Xenobiotics biodegradation and metabolism	616019±82136a	965095±629926a	1045359±1019320a	480643±55603a
Glycan biosynthesis and metabolism	658779±61306a	867047±405956a	543181±103329a	576634±40418a
Enzyme families	580632±62357a	800363±415286a	501877±141647a	490275±41244a
Metabolism of other amino acids	474214±52589a	684536±391393a	502558±277841a	389665±31817a
Metabolism of terpenoids and polyketides	409926±39088a	584943±322004a	413739±248161a	339324±22419a
Biosynthesis of other secondary metabolites	173788±24052a	281612±192528a	245507±184063a	129749±10127a

Data in the table are Mean±SD, different lowercase letters after each row of data indicate significant difference in the KEGG level2 pathway abundance of bacteria among different samples ( $P < 0.05$ , SPSS One-way ANOVA).

### 3 结论和讨论

本研究基于 16S rDNA 的高通量测序技术对来自寄主松树和室内人工饲料饲养的松墨天牛两个种群成虫的中、后肠细菌群落多样性和差异性进行了分析,共注释到 22 个门、48 个纲、112 个目、172 个科、285 个属和 408 个种。从马尾松木段中羽化的成虫肠道优势门为变形菌门和厚壁菌门,人工饲料饲养的成虫肠道优势门为变形菌门。室外种群中、后肠的优势属均为肠杆菌属,室内种群中、后肠的优势属分别为沙雷氏菌属和肠杆菌属。本研究的优势门类与已有松墨天牛肠道菌的研究结果相似,如 Hu 等<sup>[31]</sup>研究发现中国室外松墨天牛幼虫的肠道优势菌也为变形菌门;Kim 等<sup>[7]</sup>对韩国松墨天牛成虫肠道菌进行研究,发现变形菌门和厚壁菌门为优势细菌;并且在天牛科其他多种昆虫的肠道中,也有类似优势门类的报道<sup>[20,32-37]</sup>。对松墨天牛肠道细菌优

势属的研究发现国内松墨天牛幼虫肠道以肠杆菌属为主<sup>[31]</sup>,本研究的成虫肠道细菌优势属与幼虫结果类似;而国外研究显示松墨天牛室外种群成虫的中、后肠以克吕沃尔菌属(*Kluyvera*)为主,室内种群的中肠以沙雷氏菌属为主,后肠则以肠杆菌属、无色杆菌属(*Achromobacter*)和红球菌属(*Rhodococcus*)为主<sup>[7]</sup>,结果与本研究存在差异。国内的松墨天牛均采自马尾松(*Pinus massoniana*),国外的松墨天牛采自赤松(*Pinus densiflora*),国内外松墨天牛由于取食不同的寄主植物,从而塑造了不同的肠道菌群结构;室外和室内成虫种群的肠道细菌组成也随着食料的变化而改变。在本研究中,室内饲养种群的中肠细菌以沙雷氏菌属为优势属,后肠细菌的优势属依然是肠杆菌属。针对鞘翅目和鳞翅目部分昆虫肠道酸碱性的研究发现,一般中肠碱性较高,而后肠接近中性<sup>[38-39]</sup>。东秀珠和蔡妙英<sup>[40]</sup>描述沙雷氏菌属细菌适宜生长的 pH 为 5.0-9.0,因此推测沙雷氏菌属较肠杆菌



属细菌更适应碱性环境, 在中肠中的丰度更高。

从 OTUs 组成和 Alpha 多样性结果可以看出, 室内饲养的松墨天牛成虫肠道细菌的丰度远高于室外种群的肠道细菌。Kim 等<sup>[7]</sup>研究发现室内饲养种群的肠道细菌 Alpha 多样性结果也高于室外种群。本研究除了提供含有丰富碳源和氮源等营养成分的半人工饲料, 同时也提供了恒定的饲养温度, 为细菌的富集营造了良好的环境。Beta 多样性的结果显示室外种群肠道各样本的菌群组成相近, 室内种群肠道各样本的菌群组成差异明显。这种现象是因为室外种群肠道细菌长期定殖形成稳定群落的结果, 室内种群的成虫种群由于刚羽化不久即被解剖提取肠道, 菌群未定殖完成, 形成样本间的差异。

昆虫完整的生活史离不开健康的生长发育, 在此过程中肠道微生物的营养共生和解毒代谢作用显得尤为重要<sup>[10,41]</sup>。本研究通过 PICRUST 预测了松墨天牛室内外种群成虫中、后肠细菌的潜在功能, 结果显示所有样本均表现出很高的代谢功能且各样本之间无差异。昆虫的中肠和后肠作为食物消化和吸收最主要的场所, 肠道菌群发挥了重要的代谢作用<sup>[10,42]</sup>。室内外松墨天牛成虫肠道细菌主要通过代谢糖类和氨基酸等物质为宿主提供充足的营养。本研究也预测了肠道细菌对外源化学物质、萜类和聚酮类化合物及其他次生代谢物质的降解功能, 表明这些肠道细菌参与了代谢松树木质素和萜类物质的过程。研究表明肠杆菌属和沙雷氏菌属细菌在许多昆虫肠道中作为优势菌存在, 并且能够帮助宿主昆虫高效的降解纤维素、单萜或双萜等物质<sup>[22-23,43-45]</sup>。

本研究利用 Illumina HiSeq 测序技术完成了松墨天牛室内外种群成虫肠道中、后肠细菌组成

和多样性的比较分析, 预测了肠道细菌的潜在功能。研究结果表明取食不同食料的松墨天牛成虫的肠道菌群结构存在差异, 说明食物可以塑造松墨天牛肠道的菌群结构。中、后肠作为营养消化吸收的主要器官, 肠道细菌参与寄主植物木质素和纤维素分解的代谢, 为宿主松墨天牛提供营养物质, 也能降解次生代谢物质, 帮助宿主昆虫解毒, 后续研究将进行肠道中具有这些细菌的筛选和功能验证, 进一步明确松墨天牛肠道共生菌的功能及其机制。

## 参考文献

- [1] Hao DJ, Yang JX, Dai HG. Research prowess and prospect on chemical ecology of *Monochamus alternatus*. *Chinese Journal of Ecology*, 2008, 27(7): 1227-1233. (in Chinese) 郝德君, 杨剑霞, 戴华国. 松墨天牛化学生态学. 生态学杂志, 2008, 27(7): 1227-1233.
- [2] Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y. Pine wilt disease. Tokyo: Springer, 2008.
- [3] Ye JR. Epidemic status of Pine Wilt Disease in China and its prevention and control techniques and counter measures. *Scientia Silvae Sinicae*, 2019, 55(9): 1-10. (in Chinese) 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析. 林业科学, 2019, 55(9): 1-10.
- [4] 萧刚柔. 中国森林昆虫. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [5] 任骥. 松褐天牛室内饲养、幼虫龄期及成虫产卵特性的研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2014.
- [6] Chen RX, Wang LJ, Lin T, Wei ZQ, Wang Y, Hao DJ. Rearing techniques of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) on artificial diets. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 41(1): 199-202. (in Chinese) 陈瑞旭, 王露洁, 林涛, 韦志强, 王焱, 郝德君. 松墨天牛的人工饲养技术研究. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(1): 199-202.
- [7] Kim JM, Choi MY, Kim JW, Lee SA, Ahn JH, Song J, Kim SH, Weon HY. Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two *Cerambycidae* species (Coleoptera). *Journal of Microbiology*, 2017, 55(1): 21-30.

- [8] Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 2004, 49: 71–92.
- [9] Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?. *Molecular Ecology*, 2012, 21(20): 5124–5137.
- [10] Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *Fems Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 699–735.
- [11] Tian XY, Song FP, Zhang J, Liu RM, Zhang XP, Duan JY, Shu CL. Diversity of gut bacteria in larval *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae) fed on corn stalk. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(6): 632–641. (in Chinese)  
田小燕, 宋福平, 张杰, 刘荣梅, 张兴鹏, 段江燕, 束长龙. 饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫肠道细菌多样性. *昆虫学报*, 2017, 60(6): 632–641.
- [12] Mei C, Fan S, Yang H. The strategies of isolation of insect gut microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 985–994. (in Chinese)  
梅承, 范硕, 杨红. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展. *微生物学报*, 2018, 58(6): 985–994.
- [13] Dillon R, Charnley K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 2002, 153(8): 503–509.
- [14] Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 293–300.
- [15] Hayashi A, Aoyagi H, Yoshimura T, Tanaka H. Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(4): 358–367.
- [16] Chandler JA, Lang JM, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genetics*, 2011, 7(9): e1002272.
- [17] Wei DF, Wang XJ, Yang J, Geng YX, Chen M. Analysis of the diversity and difference of intestinal bacteria in larvae *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) on different diets. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39(3): 515–524. (in Chinese)  
魏丹峰, 王秀吉, 杨锦, 耿涌鑫, 陈敏. 取食不同食料的美国白蛾幼虫肠道细菌多样性及差异性研究. *环境昆虫学报*, 2017, 39(3): 515–524.
- [18] Calderón-Cortés N, Quesada M, Watanabe H, Cano-Camacho H, Oyama K. Endogenous plant cell wall digestion: a key mechanism in insect evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2012, 43(1): 45–71.
- [19] Zhou JP, Huang HQ, Meng K, Shi PJ, Wang YR, Luo HY, Yang PL, Bai YG, Zhou ZG, Yao B. Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from the symbiotic *Sphingobacterium* sp. TN19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(2): 323–333.
- [20] Geib SM, Del Mar Jimenez-Gasco M, Carlson JE, Tien M, Hoover K. Effect of host tree species on cellulase activity and bacterial community composition in the gut of larval Asian Longhorned beetle. *Environmental Entomology*, 2009, 38(3): 686–699.
- [21] Raffa KF, Aukema BH, Erbilgin N, Klepzig KD, Wallin KF. Interactions among conifer terpenoids and bark beetles across multiple levels of scale: an attempt to understand links between population patterns and physiological processes. *Recent Advances in Phytochemistry*, 2005, 39: 79–118.
- [22] Adams AS, Aylward FO, Adams SM, Erbilgin N, Aukema BH, Currie CR, Suen G, Raffa KF. Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(11): 3468–3475.
- [23] Berasategui A, Salem H, Paetz C, Santoro M, Gershenzon J, Kaltentpoth M, Schmidt A. Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, 2017, 26(15): 4099–4110.
- [24] Stewart CN Jr, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 1993, 14(5): 748–750.
- [25] Wu XQ, Xue Q, Xiang Y, Ding XL, Xu XL, Ye JR. Community and functional diversity of bacteria associated with propagative and dispersal forms of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 2016, 18(10): 1185–1198.
- [26] Magoč T, Salzberg SL. Flash: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [27] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.

- [28] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [29] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [30] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814–821.
- [31] Hu X, Li M, Raffa KF, Luo QY, Fu HJ, Wu SQ, Liang GH, Wang R, Zhang FP. Bacterial communities associated with the pine wilt disease vector *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) during different larval instars. *Journal of Insect Science*, 2017, 17(6): 115.
- [32] Schloss PD, Delalibera I Jr, Handelsman J, Raffa KF. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 2006, 35(3): 625–629.
- [33] Park DS, Oh HW, Jeong WJ, Kim H, Park HY, Bae KS. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(5): 394–401.
- [34] Grünwald S, Pilhofer M, Höll W. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(1): 25–34.
- [35] Rizzi A, Crotti E, Borruso L, Jucker C, Lupi D, Colombo M, Daffonchio D. Characterization of the bacterial community associated with larvae and adults of *Anoplophora chinensis* collected in Italy by culture and culture-independent methods. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 420287.
- [36] Vicente CSL, Nascimento FX, Espada M, Barbosa P, Hasegawa K, Mota M, Oliveira S. Characterization of bacterial communities associated with the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*, the insect vector of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 347(2): 130–139.
- [37] Alves M, Pereira A, Matos P, Henriques J, Vicente C, Aikawa T, Hasegawa K, Nascimento F, Mota M, Correia A, Henriques I. Bacterial community associated to the pine wilt disease insect vectors *Monochamus galloprovincialis* and *Monochamus alternatus*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23908.
- [38] Lemke T, Stingl U, Egert M, Friedrich MW, Brune A. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ehippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6650–6658.
- [39] Chapman RF, Simpson SJ, Douglas AE. The Insects: structure and function. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- [40] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [41] Wei G, Bai L, Qu S, Wang SB. Insect microbiome and their potential application in the insect pest and vector-borne disease control. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1090–1102. (in Chinese)  
魏舸, 白亮, 曲爽, 王四宝. 昆虫共生微生物在病虫害和疾病控制上的应用前景. 微生物学报, 2018, 58(6): 1090–1102.
- [42] Douglas AE. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 2015, 60(1): 17–34.
- [43] Adams L, Boopathy R. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology*, 2005, 96(14): 1592–1598.
- [44] Howe M, Keefover-Ring K, Raffa KF. Pine engravers carry bacterial communities whose members reduce concentrations of host monoterpenes with variable degrees of redundancy, specificity, and capability. *Environmental Entomology*, 2018, 47(3): 638–645.
- [45] Hu X, Fu HJ, Li JN, Lin ZP, Zhang FP. Isolation and identification of cellulolytic bacteria associated with the gut of *Monochamus alternatus* larvae. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2018, 47(3): 322–328. (in Chinese)  
胡霞, 傅慧静, 李俊楠, 林中平, 张飞萍. 松墨天牛幼虫肠道纤维素降解细菌的分离与鉴定. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2018, 47(3): 322–328.

# Diversity and function of intestinal bacteria in adult *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) fed indoors and outdoors

Hongjian Chen<sup>1,2</sup>, Yang Zhou<sup>1,2</sup>, Xiaohong Xia<sup>1,2</sup>, Xinyi Zhao<sup>1,2</sup>, Heng Qiao<sup>1,2</sup>, Jiajin Tan<sup>1,2</sup>, Dejun Hao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup>College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] In order to clarify the bacterial community structure in the midgut and hindgut of adult *Monochamus alternatus*, and to explore the potential function of intestinal bacteria. [Methods] The gut DNA from 15 individuals (15 midguts, 15 hindguts of outdoor and 15 midguts, 15 hindguts of indoor) of adult *Monochamus alternatus* fed indoors and outdoors were extracted. The 16S rDNA V3–V4 region of the intestinal bacteria of *Monochamus alternatus* was sequenced through next generation sequencing techniques. The number of OTUs was counted, the species composition, alpha diversity and beta diversity were analyzed, and the functions of intestinal bacteria were predicted by PICRUSt software. [Results] A total of 544180 high-quality sequences were obtained and clustered into 615 OTUs under 97% similarity, which were annotated into 22 phyla, 48 classes, 112 orders, 172 families, 285 genera and 408 species. The number of OTUs in indoor population was more than that in outdoor population, and there were differences between indoor and outdoor population. The difference between midgut and hindgut of the same population was not obvious. *Proteobacteria* was the most dominant genus of intestinal bacteria in both indoor and outdoor populations of *Monochamus alternatus*; *Enterobacter* was the most dominant genus of intestinal bacteria in outdoor populations and hindgut bacteria in indoor populations, *Serratia* was the most dominant genus of midgut bacteria in indoor populations. The results of alpha diversity showed that the richness of intestinal bacterial community in indoor populations was significantly higher than that in outdoor populations, and the beta diversity showed that the homogeneity and stability of intestinal bacterial community in outdoor populations were better than that in indoor populations. There was no significant difference in bacterial richness and diversity between the midgut and hindgut of outdoor and indoor populations. The results of functional prediction showed that the metabolic pathway was the most abundant in the intestinal bacteria of adults, which mainly consisted of carbohydrate metabolism and amino acid metabolism, and these bacteria were also able to degrade xenobiotics, terpenoids, polyketides and other secondary metabolites. There was no significant difference in functional abundance among different populations and different intestinal segments. [Conclusion] The community structure and difference of bacteria in the midgut and hindgut of adult *Monochamus alternatus* fed on different food were determined. The potential role of intestinal bacteria was understood, which provided a theoretical basis for further investigating the function of intestinal symbiosis bacteria of *Monochamus alternatus*.

**Keywords:** *Monochamus alternatus*, adult, intestinal bacteria, community structure, function prediction

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470650) and by the National Key R&D Program of China (2018YFC120040)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85428583; E-mail: djhao@njfu.edu.cn

Received: 19 May 2020; Revised: 13 July 2020; Published online: 24 February 2021