



不同地区的东亚飞蝗肠道微生物多样性分析

杨丽君^{1,2}, 李红卫¹, 白国栋³, 于艳雪^{1*}

1 中国检验检疫科学研究院植物检验与检疫研究所, 北京 100176

2 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193

3 赤峰市森林草原保护发展中心, 内蒙古 赤峰 024005

杨丽君, 李红卫, 白国栋, 于艳雪. 不同地区的东亚飞蝗肠道微生物多样性分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 251-267.

YANG Lijun, LI Hongwei, BAI Guodong, YU Yanxue. Diversity of gut microbiota in *Locusta migratoria manilensis* Meyen from different regions of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 251-267.

摘要:【目的】鉴于肠道微生物在昆虫环境适应过程中发挥重要作用, 探索中国不同地区分布的东亚飞蝗肠道微生物多样性情况。【方法】本文利用 Illumina NovaSeq 测序平台对中国 4 个代表性蝗区的东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis* Meyen)肠道微生物进行 16S rRNA 基因测序和分析, 探究其多样性。【结果】分布区域、发育时期和性别对东亚飞蝗肠道微生物结构均影响明显, 其中分布区域的影响最为显著, 其次为性别和发育时期。多样性分析发现, 采自广东省清远市和河北省沧州市的东亚飞蝗肠道微生物多样性差异性较大, 所选取的 8 个环境因子中平均气温和降水量可影响东亚飞蝗的肠道菌群多样性。【结论】研究结果从共生微生物和环境因素角度解析了东亚飞蝗的环境适应性, 为研制地理溯源技术和开发微生物制剂提供了科学依据。

关键词: 东亚飞蝗; 16S rRNA 基因; 肠道微生物

资助项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项(2020JK005)

This work was supported by the Special Expenses for Basic Scientific Research of China Academy of Inspection and Quarantine (2020JK005).

*Corresponding author. E-mail: yuyx@caiq.org.cn

Received: 2022-04-24; Accepted: 2022-06-26; Published online: 2022-07-14

Diversity of gut microbiota in *Locusta migratoria manilensis* Meyen from different regions of China

YANG Lijun^{1,2}, LI Hongwei¹, BAI Guodong³, YU Yanxue^{1*}

1 Institute of Plant Inspection and Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

2 College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China

3 Chifeng Forest and Grassland Protection and Development Center, Chifeng 024005, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] Gut microbiota plays an important role in the environmental adaptation of insects. This study aims to explore the diversity of gut microbiota in *Locusta migratoria manilensis* Meyen from different regions of China. [Methods] The Illumina NovaSeq platform was used to sequence the 16S rRNA gene of gut microbiota in *L. migratoria manilensis* Meyen from four representative locust regions in China. [Results] Geographical location, development stage, and gender affected the structure of gut microbiota, among which geographical location had the most significant effect, followed by gender and development stage. The *L. migratoria manilensis* Meyen from Qingyuan City, Guangdong Province and Cangzhou City, Hebei Province showed the largest difference in the diversity of gut microbiota. Mean temperature and precipitation among the eight selected environmental factors may influence the gut microbiota diversity. [Conclusion] This study analyzed the environmental adaptability of *L. migratoria manilensis* Meyen from the perspective of symbiotic microorganisms and environmental factors, which provided a basis for the development of technology for tracing geographical origin and microbial preparations.

Keywords: *Locusta migratoria manilensis* Meyen; 16S rRNA gene; gut microbiota

相比于其他的动物，昆虫是自然界数量最多、分布最广泛的类群之一^[1]。据统计，世界上昆虫种类总数约 400 万至 1 000 万种，占据地球上动物所有种类总数的 90%以上^[2]。昆虫种类繁多，与其体内复杂多样的肠道微生物关系密切，这些微生物与宿主相互作用，相互影响，形成一种协同进化的关系^[3]。人们通过分析昆虫肠道微生物的多样性及环境因子改变下的菌群结构及动态变化，来进一步了解宿主昆虫与肠道微生物间的关系^[4]。肠道微生物通过影响昆虫对食物的消化吸收、信息化合物的合成等来调控其对寄主的选择和繁殖等行为^[5]。另一方面，肠道微生物种群结构的多样性与昆虫种类、发育时期、区域分布、食物条件和消

化道形态等因素息息相关^[6]。近年来，越来越多的昆虫肠道微生物多样性和生物学特性被揭示，并在害虫防治、农业生产和能源领域方面显示出巨大的应用潜力。

关于蝗虫肠道微生物多样性的研究，近年来可见一些报道。Dillon 等对沙漠蝗(*Schistocerca gregaria* Forskal)的成虫肠道微生物在饥饿和虫龄 2 个影响因子作用下的多样性进行分析，结果显示细菌多样性随着蝗虫龄期的增加而增加，受饥饿的蝗虫通常容易发生疾病，其中 *Gammaproteobacteria* 菌群的增加可以抵抗蝗虫肠道受到病原的威胁^[7]；Su 等通过研究 16 种蝗虫的肠道共生菌，发现纤维素分解酶和肠道微生物群落可能反映了不同种类的蝗虫

与其摄食方式的联系^[8]；徐冲等从东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) 肠道内分离出 12 株产纤维素酶细菌，并对其中一株酶活性较高的菌株进行分析，鉴定其为蜡样芽孢杆菌^[9]。有关蝗虫肠道微生物的研究多集中于微生物的形态和分类等方面，对于微生物的功能、群落结构多样性以及与蝗虫区域分布等之间关系的报道不多^[10]。进一步明确东亚飞蝗肠道微生物多样性与其分布区域、性别和发育时期之间的关系十分必要。

随着气候变化异常及生态环境恶化等因素的影响，我国蝗虫灾害的发生近年来有加重趋势，对农牧业发展和生态环境保护带来威胁^[11]。东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) 作为我国的主要蝗虫种类，其分布范围广、种群数量大，一旦暴发需要耗费大量经济成本去防治。因此，本文通过利用 Illumina NovaSeq 测序平台对东亚飞蝗肠道微生物多样性进行研究，分析不同地理区系、发育时期、性别及环境因子对东亚飞蝗肠道微生物的影响，探寻地理溯源新方法，也为开发微生物制剂和提高绿色防治技术提供新思路，让人们从根本上做到不再谈“蝗”色变。

表 1 东亚飞蝗样品采集信息表

Table 1 Sample collection information table of *Locusta migratoria manilensis* Meyen

Collection sites	Stadium	Sex	Number	Code
Dongying City, Shandong Province	4th instar	Female	84	SD4-F
		Male	54	SD4-M
	5th instar	Female	21	SD5-F
		Male	65	SD5-M
Cangzhou City, Hebei Province	5th instar	Female	25	HC5-F
		Male	27	HC5-M
	Imago	Female	28	HCA-F
		Male	30	HCA-M
Qingyuan City, Guangdong Province	5th instar	Female	33	GQ5-F
		Male	27	GQ5-M
	Imago	Female	34	GQA-F
		Male	30	GQA-M
Kunming City, Yunnan Province	Imago	Female	32	YKA-F
		Male	38	YKA-M

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

采集了中国 4 个地区的东亚飞蝗蝗蛹和成虫，具体信息见表 1。

1.2 东亚飞蝗样品准备

在 4 个地区随机选取 4 龄、5 龄和成虫的东亚飞蝗，每个地区相同龄期的雌虫随机选取 3 头，作为 3 个重复，雄虫随机选取 3 头，作为 3 个重复，4 个地区 7 种虫态，共 42 个样品。用酒精和 PBS 溶液分别冲洗 2 遍，每次 1 min；将清洗后的虫体放在蜡盘上进行解剖，取出后肠放入离心管中，每头放入一个 2 mL 离心管中，然后在研磨机上研磨，研磨结束放入冰箱备用。

1.3 肠道微生物基因组提取及检测

按照试剂盒的步骤提取样本组织 DNA：

(1) 在样品中加入 1 mL Inhibit EX Buffer，混匀后置于 70 °C 加热 5 min，室温下 20 000×g 离心 1 min。

(2) 取 200 μL 上清液，依次加入 15 μL Proteinase K 和 200 μL Buffer AL，充分混匀后 70 °C 孵育 10 min。

(3) 向混合液中加入 200 μL 酒精, 充分混匀后全部滴到新 QIAamp 离心柱中, 离心 1 min。

(4) 加入 500 μL Buffer AW1, 离心 1 min。然后加入 500 μL Buffer AW2, 离心 3 min, 弃含滤液的管。

(5) 将离心柱转移到新管中, 加入 200 μL Buffer ATE。室温孵育 1 min, 20 000 $\times g$ 离心 1 min。最后进行凝胶电泳检测。

1.4 PCR 扩增和纯化

将提取的东亚飞蝗肠道基因组 DNA 作为 PCR 的模板, 采用 16S rRNA 基因 V3-V4 扩增引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') 进行 PCR 扩增, 使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测。然后根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样, 充分混匀后使用 1 \times TAE 浓度为 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 割胶回收目标条带。

1.5 文库构建和上机测序

使用 Illumina 公司 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 建库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测, 合格后进行上机测序。测序得到的原始数据存在一定的干扰数据, 为了使信息分析的结果更加准确可靠, 首先对原始数据进行拼接、过滤和降噪, 得到有效数据; 随后对得到的有效数据进行物种注释以及丰度分析, 从而揭示样本的物种构成; 最后通过 α 多样性、 β 多样性分析、物种差异性分析和环境因子相关性分析, 挖掘样本间群落结构的差异。

2 结果与分析

2.1 序列拼接组装与 OTU 聚类分析

通过 Illumina NovaSeq 测序平台对不同地理分布的东亚飞蝗肠道微生物 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域进行测序, 发现不同地理分布、发育

时期和性别的东亚飞蝗肠道菌群测序所得的条带数都有所差异(表 2)。其中来自河北省沧州市雌成虫(HCA-F)样品得到的优化序列数最多(117 086 条), 广东省清远市 5 龄雌虫(GQ5-F)样品的优化序列数量最少(103 705 条)。42 个样品通过测序平均得到 118 086 对 reads, 经拼接、过滤后平均共产生 111 497 条 clean tags, 有效序列所占比例为 94.4 %, 样品的测序准确度较好, 满足分析标准。每个样品分别获得的分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)数目如表 2 所示, 对比不同地理分布的成虫可以看出, 广东省清远市成虫(GQA)样品获得的 OTU 数量最多, 河北省沧州市成虫(HCA)样品获得的 OTU 数量最少; 对比不同发育时期的东亚飞蝗可以看出, 广东省清远市成虫(GQA)比 5 龄虫(GQ5) OTU 数量多, 河北省沧州市成虫(HCA)比 5 龄虫(HC5) OTU 数量少, 山东省东营市 5 周龄虫(SD5)比 4 周龄虫(SD4) OTU 数量少; 对比不同性别的东亚飞蝗可以看出, 除广东省清远市成虫(GQA)和山东省东营市 4 龄虫(SD4)的雌雄之间 OTU 数量差异略大以外, 其余均相差不大。各个地理分布的东亚飞蝗肠道微生物在不同的分类阶元注释出的物种数目如表 2 所示, 其中河北省沧州市 5 龄雄虫(HC5-M)样品在各个分类阶元所得到的注释数均略高于其他样品, 有 26 个门 57 个纲 133 个目 196 个科 293 个属 332 个种。广东省清远市 5 龄雌虫(GQ5-F)样品在各个分类阶元的注释数均略低于其他样品。

2.2 东亚飞蝗肠道微生物 α 多样性分析

α 多样性指数评估可以反映样本内菌群的多样性。从表 3 可以看出, 不同地理分布、发育时期和性别的东亚飞蝗肠道微生物多样性各不相同。其中 Chao 1 值最大的为广东省清远市雄性成虫, 表明样品群落中低丰度物种最多, 最小的是广东省清远市 5 龄雌虫, 样品群落中

低丰度物种最少。从 Goods_coverage 来看, 所有地理种群样品的 Goods_coverage 指数均接近于 1, 说明样品中序列检测率很高, 该测序结果基本符合样品中肠道微生物的真实情况。从

Shannon 和 Simpson 指数可以看出, 广东省清远市雄性成虫(GQA-M)的物种丰富度和均匀度最高, 而山东省东营市 4 龄雄虫(SD4-M)的物种丰富度和均匀度最低。

表 2 东亚飞蝗肠道微生物 16S rRNA 基因高通量测序基本信息

Table 2 Basic information of high-throughput sequencing of 16S rRNA gene in the gut of *Locusta migratoria manilensis* Meyen

Sample	Raw paired reads	Clean paired reads	Number of OTUs	Number of taxa of different taxonomic categories					
				Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
GQ5-F	114 164	103 705	214	11	15	34	55	87	97
GQ5-M	120 761	114 151	261	14	24	57	86	125	141
GQA-F	116 317	112 280	485	24	45	102	152	216	247
GQA-M	121 212	112 886	756	22	42	101	165	267	322
HC5-F	120 675	114 357	444	20	34	82	129	204	234
HC5-M	119 975	111 347	651	26	57	133	196	293	332
HCA-F	121 801	117 086	331	13	18	47	74	123	141
HCA-M	117 387	107 597	458	14	18	48	77	118	134
SD4-F	116 829	112 222	667	22	42	102	157	244	285
SD4-M	116 678	110 971	343	24	43	89	130	174	188
SD5-F	117 742	109 282	281	15	25	54	82	117	128
SD5-M	114 156	110 403	325	16	21	52	83	135	158
YKA-F	118 565	110 096	389	19	31	72	109	155	176
YKA-M	116 937	114 580	430	23	39	81	118	179	205

表 3 东亚飞蝗不同地理种群肠道微生物 α 多样性分析

Table 3 Alpha diversity of gut microorganisms in different geographical populations of *Locusta migratoria manilensis* Meyen

Sample	Chao 1	Goods_coverage	Shannon	Simpson
GQ5-F	220	1.000	2.951	0.668
GQ5-M	274	0.999	3.725	0.834
GQA-F	497	0.999	4.082	0.837
GQA-M	766	1.000	4.954	0.890
HC5-F	453	0.999	4.152	0.803
HC5-M	672	0.999	3.883	0.782
HCA-F	341	0.999	3.109	0.708
HCA-M	468	0.999	3.889	0.810
SD4-F	683	0.999	4.544	0.848
SD4-M	366	0.999	2.887	0.725
SD5-F	288	1.000	3.833	0.851
SD5-M	327	1.000	4.506	0.896
YKA-F	403	0.999	3.885	0.856
YKA-M	440	0.999	4.079	0.821

2.3 东亚飞蝗肠道微生物 β 多样性分析

为探究不同地理分布的东亚飞蝗肠道微生物组成的差别，我们根据所有样本在属水平的物种注释及丰度信息，选取丰度排名前 35 的属，绘制了物种丰度聚类热图。结果如图 1 所示，山东省东营市 5 龄雌雄样品的菌群组成比 4 龄雌雄样品菌群组成差异大；河北省沧州市

5 龄雌雄比成虫雌雄样品的菌群组成差异大；广东省清远市成虫雌雄样品的菌群组成差异大；云南省昆明市成虫雌雄样品菌群组成差异大。从整体来看，几乎没有 4 个地理品种共有且丰度较高的菌属，说明不同地理种群的东亚飞蝗肠道微生物组成有明显的差异。

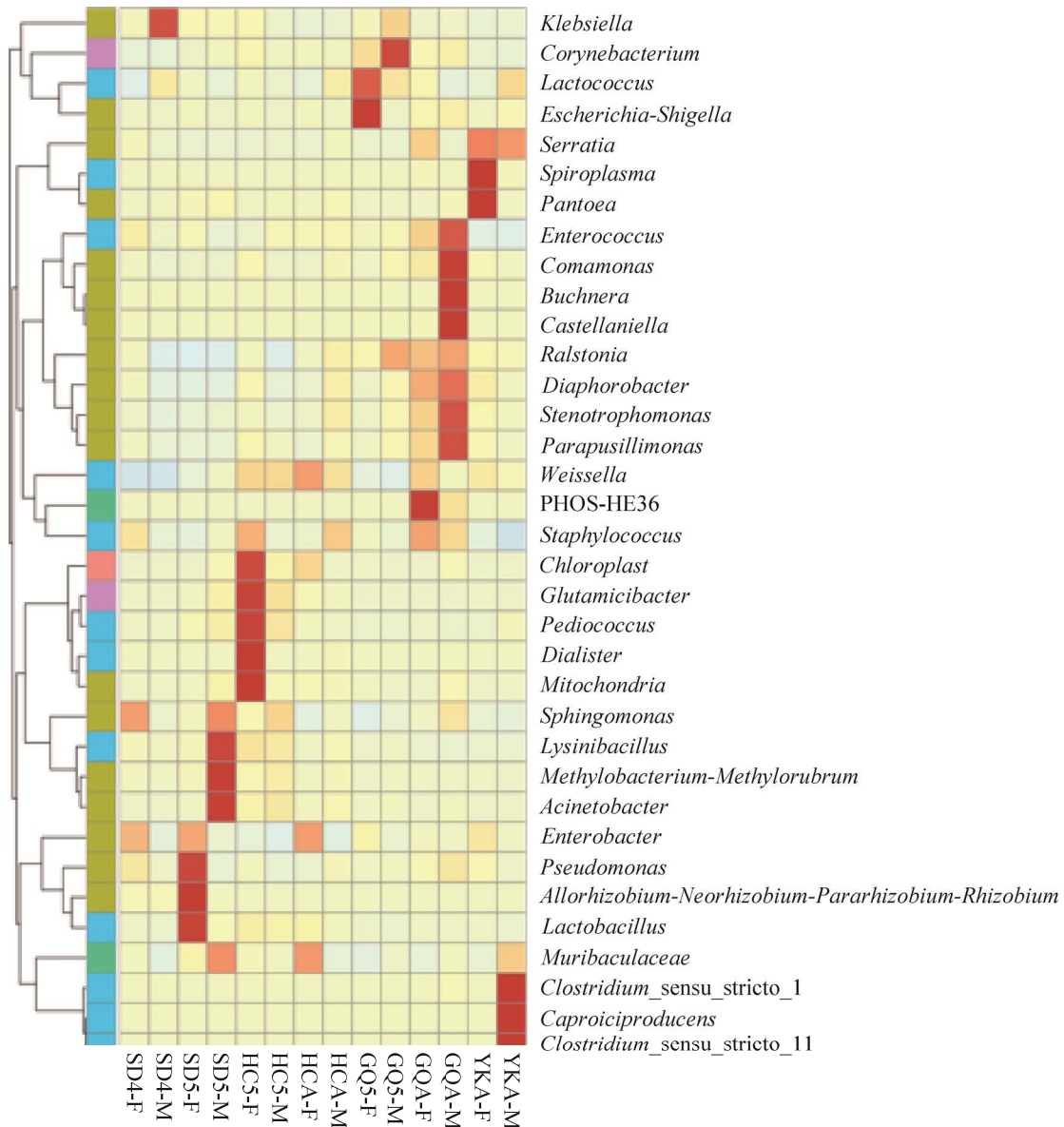


图 1 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物组成热图(属水平)

Figure 1 Heat map of gut microbial composition of *Locusta migratoria manilensis* Meyen in different geographical populations (genus level).

为了更直观地对不同地理分布东亚飞蝗肠道微生物差异进行聚类分析, 我们采用了 NMDS 方法。结果如图 2A, 不同地理种群的

东亚飞蝗肠道微生物差异较大, 针对差异最大的两组(GQ5-F 和 HC5-F)进一步进行了 LEfSe 分析(图 2B)。其中广东省清远市 5 龄雌虫

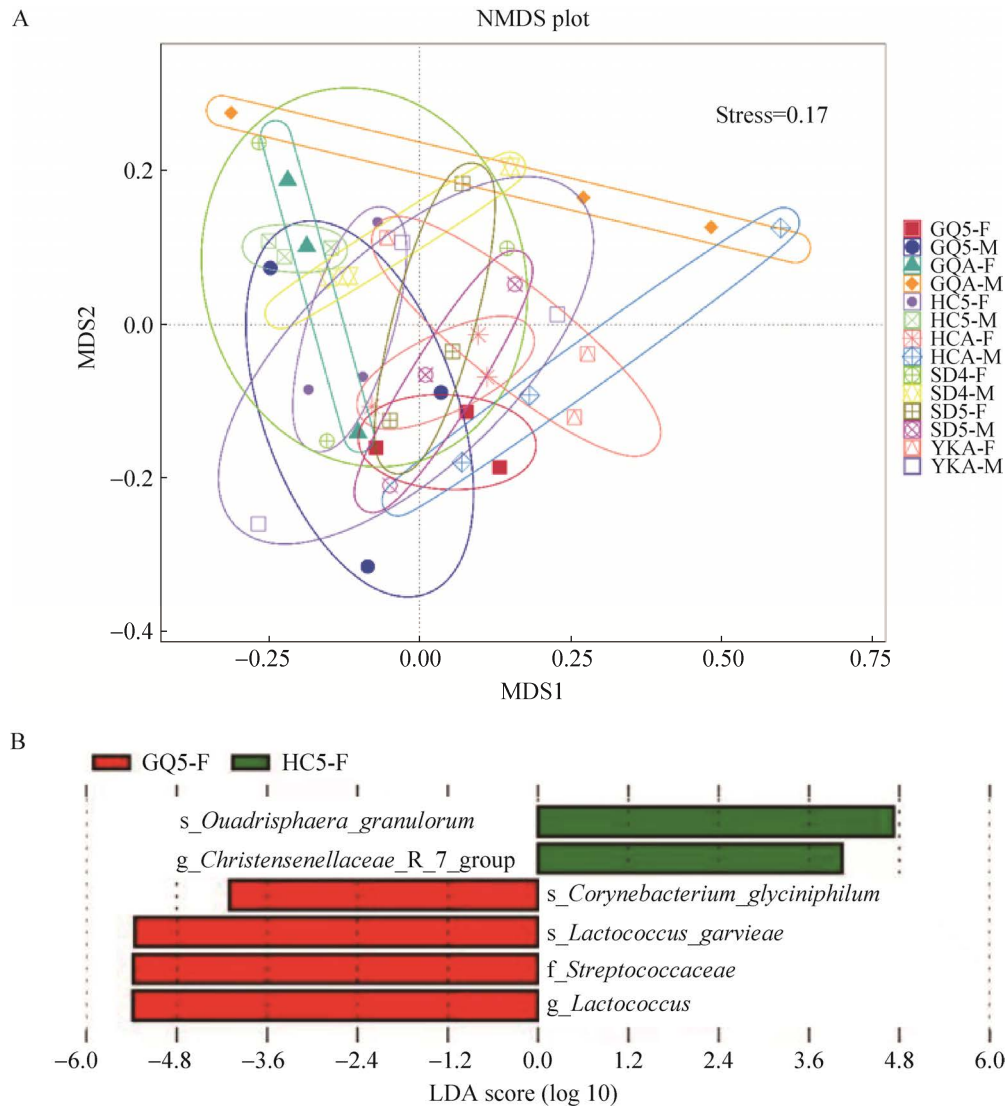


图 2 不同地理种群东亚飞蝗的 NMDS 聚类分析(A)及 LEfSe 分析图(B)

Figure 2 NMDS analysis (A) and LEfSe analysis (B) plots of *Locusta migratoria manilensis* Meyen in different geographical populations. GQ5-F: Female 5th instar of Qingyuan City, Guangdong Province; GQ5-M: Male 5th instar of Qingyuan City, Guangdong Province; GQA-F: Female imago of Qingyuan City, Guangdong Province; GQA-M: Male imago of Qingyuan City, Guangdong Province; HC5-F: Female 5th instar of Cangzhou City, Hebei Province; HC5-M: Male 5th instar of Cangzhou City, Hebei Province; HCA-F: Female imago of Cangzhou City, Hebei Province; HCA-M: Male imago of Cangzhou City, Hebei Province; SD4-F: Female 4th instar of Dongying City, Shandong Province; SD4-M: Male 4th instar of Dongying City, Shandong Province; SD5-F: Female 5th instar of Dongying City, Shandong Province; SD5-M: Male 5th instar of Dongying City, Shandong Province; YKA-F: Female imago of Kunming City, Yunnan Province; YKA-M: Male imago of Kunming City, Yunnan Province.

(GQ5-F)组中的 *s_Corynebacterium_glyciniphium*、*s_Lactococcus_garieae*、*f_Streptococcaceae*、*g_Lactococcus* 的丰度显著高于河北省沧州市 5 龄雌虫(HC5-F)，而河北省沧州市 5 龄雌虫(HC5-F)中的 *s_Quadrisphaera-graunlorum* 和 *g_Christensenellaceae_R_7_group* 的丰度显著高于广东省清远市 5 龄雌虫(GQ5-F)。

2.4 东亚飞蝗肠道微生物的组成分析

东亚飞蝗肠道样本在门分类阶元水平上的微生物群落组成如图 3 所示。主要有变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、单芽胞菌门(*Gemmatimonadota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、*MBNT15* 和粘球菌门(*Myxococcota*)等。不同地理分布样品的肠道菌群组成具有明显的差异，其中河北省沧州市(HC)和广东省清远市(GQ)样品的优势菌门为厚壁菌门(47.8%，49.8%)和变形菌门(40.3%，45.6%)，次优势菌门为放线菌门(1.1%，0.8%)。山东省东营市(SD)样品的优势菌门是变形菌门(72.3%)和厚壁菌门(23.6%)，次优势菌门为放线菌门(0.7%)。云南省昆明市(YK)样品的优势菌门是变形菌门(47.9%)和厚壁菌门(41.1%)，次优势菌门为拟杆菌门(0.6%)。山东省东营市(SD)、河北省沧州市(HC)和云南省昆明市(YK)三地样品不同性别东亚飞蝗的肠道菌群门水平组成差异不显著。广东省清远市(GQ)不同发育时期的蝗虫样品均为雄性比雌性变形菌门丰度增加，厚壁菌门减少。4 个地区不同发育时期样品的肠道菌群门水平组成上没有显著差异。

在纲分类阶元水平上，东亚飞蝗的肠道微生物主要有芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、梭菌纲(*Clostridia*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、蓝藻纲(*Cyanobacteriia*)、

α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、*Ignavibacteria*、厚壁菌纲(*Negativicutes*)和芽单胞菌纲(*Gemmatimonadetes*)等。其中河北省沧州市(HC)和广东省清远市(GQ)样品的优势菌纲为芽孢杆菌纲(46.1%，48.9%)和 γ -变形菌纲(38.9%，44.6%)，次优势菌纲为梭菌纲(1.5%，0.9%)和 α -变形菌纲(1.4%，1.0%)。山东省东营市(SD)样品的优势菌纲是 γ -变形菌纲(70.2%)和芽孢杆菌纲(22.6%)，次优势菌纲为 α -变形菌纲(2.0%)。云南省昆明市(YK)样品的优势菌纲是 γ -变形菌纲(47.4%)和芽孢杆菌纲(37.4%)，次优势菌纲为梭菌纲(3.0%)。山东省东营市(SD)、河北省沧州市(HC)和云南省昆明市(YK)三地样品不同性别东亚飞蝗的肠道菌群纲水平组成差异不显著。广东省清远市(GQ)不同发育时期的蝗虫样品均为雄性比雌性 γ -变形菌纲丰度增加，拟杆菌纲减少。4 个地区不同发育时期样品的肠道菌群纲水平组成上没有显著差异。

在目分类阶元水平上，东亚飞蝗的肠道微生物主要有芽孢杆菌目(*Bacilli*)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、葡萄球菌目(*Staphylococcales*)、梭菌目(*Clostridia*)、昆虫胞浆菌目(*Entomoplasmatales*)、伯克氏菌目(*Burkholderiales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)和肠杆菌目(*Enterobacterales*)等。与门和纲分类阶元水平相同，河北省沧州市(HC)和广东省清远市(GQ)在菌群组成上相似，优势菌目为乳杆菌目(43.5%，46.4%)和肠杆菌目(37.3%，39.6%)，次优势菌目为葡萄球菌目(2.0%，2.0%)。山东省东营市(SD)样品的优势菌目分别为肠杆菌目(68.1%)和乳杆菌目(20.5%)，云南省昆明市(YK)的优势菌目为肠杆菌目(45.8%)和乳杆菌目(32.9%)，山东省东营市(SD)、河北省沧州市(HC)和云南省昆明市(YK)

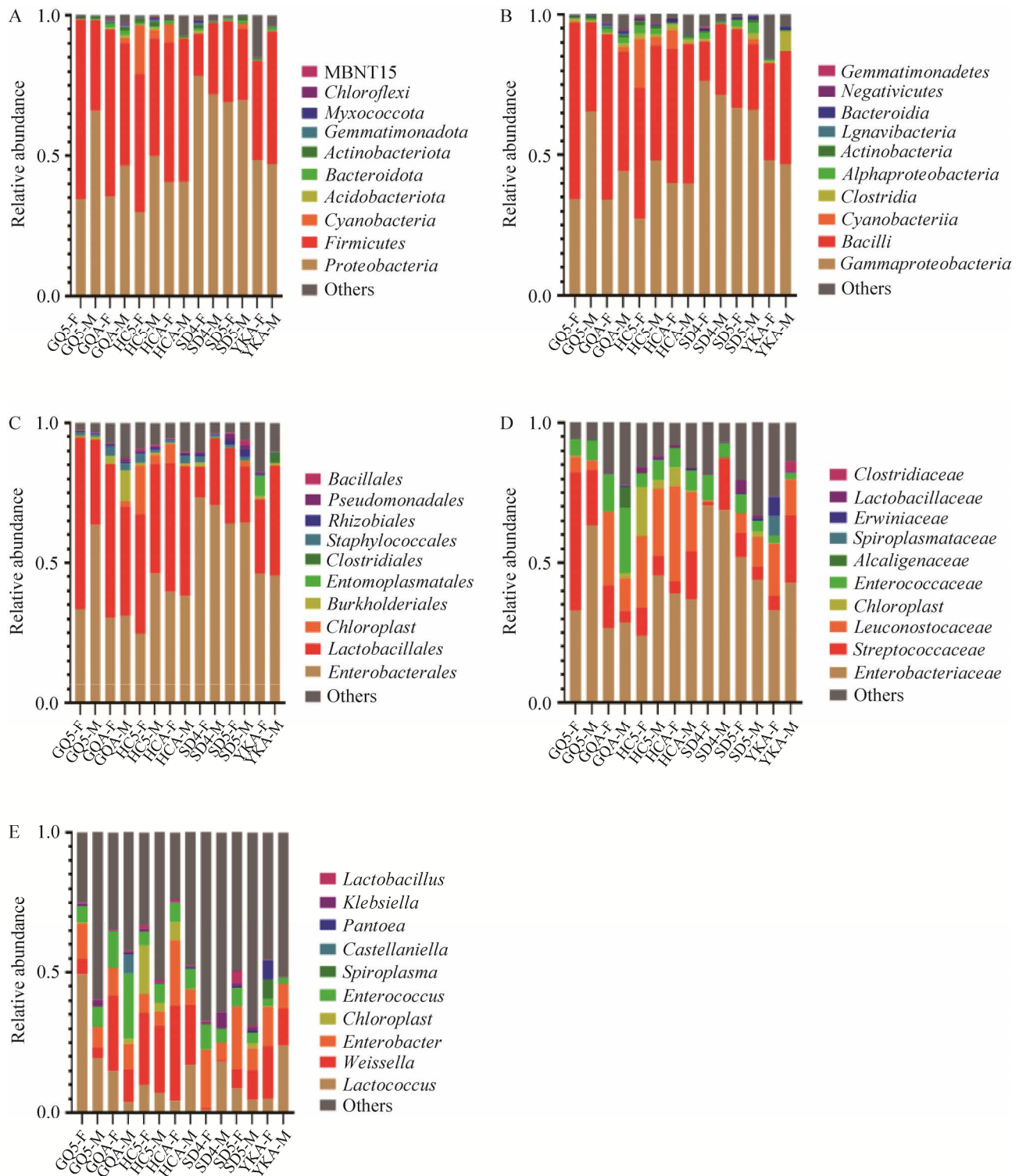


图 3 不同地理种群的东亚飞蝗前 10 个肠道菌群组成

Figure 3 Composition of the top ten gut microbiota of *Locusta migratoria manilensis* Meyen in different geographical populations. A: Phylum. B: Class. C: Order. D: Family. E: Genus.

三地样品不同性别东亚飞蝗的肠道菌群目水平组成差异不显著。广东省清远市(GQ)不同发育时期的蝗虫样品均为雄性比雌性肠杆菌目丰度增加,乳杆菌目减少。4个地区不同发育时期样品的肠道菌群目水平组成上没有显著差异。

在科分类阶元水平上,东亚飞蝗的肠道微生物主要有梭菌科(*Clostridiaceae*)、乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)、肠杆菌科(*Erwiniaceae*)、螺原体科(*Spiroplasmataceae*)、产碱杆菌科(*Alcaligenaceae*)、肠球菌科(*Enterococcaceae*)、明串珠菌科(*Leuconostocaceae*)、链球菌科(*Streptococcaceae*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)等。4个地区样品的菌群在科水平上的优势菌科均为肠杆菌科,各个地理分布的样品的次优势菌科差异较大。广东省清远市(GQ)样品的次优势菌科为链球菌科(22.0%)、肠球菌科(12.2%)和明串珠菌科(11.9%),河北省沧州市(HC)样品的次优势菌科为明串珠菌科(26.2%),山东省东营市(SD)样品的次优势菌科为链球菌科(0.8%),云南省昆明市(YK)次优势菌科为明串珠菌科(15.9%)和链球菌科(14.6%)。山东省东营市(SD)、河北省沧州市(HC)和云南省昆明市(YK)三地样品不同性别东亚飞蝗的肠道菌群科水平组成差异不显著。广东省清远市(GQ)5龄蝗虫样品为雄性比雌性肠杆菌科丰度增加,链球菌科减少。4个地区不同发育时期样品的肠道菌群科水平组成上没有显著差异。

在属的分类阶元水平上,东亚飞蝗的肠道

微生物主要有乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、反硝化卡斯特兰尼氏菌属(*Castellaniella*)、螺原体属(*Spiroplasma*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和乳球菌属(*Lactococcus*)等。不同地理种群的样品在属水平上的差异较大。河北省沧州市(HC)样品在属水平上的优势菌为魏斯氏菌属(26.2%)和肠杆菌属(10.1%),广东省清远市(GQ)样品的优势菌属为乳球菌属(22.0%)和肠杆菌属(12.2%),山东省东营市(SD)的优势菌属为肠杆菌属(14.2%)和乳球菌属(8.3%),云南省昆明市(YK)样品的优势菌属为魏斯氏菌属(15.9%),次优势菌属为乳球菌属(14.5%)。不同性别东亚飞蝗的肠道菌群属水平组成差异显著。云南省昆明市成虫(YKA)样品为雄性比雌性乳酸杆菌属丰度增加,其余各组东亚飞蝗均为雄性比雌性乳酸杆菌属丰度降低。4个地区不同发育时期样品的肠道菌群属水平组成上差异显著。

2.5 地理环境因子与东亚飞蝗肠道微生物结构的相关性分析

地理分布的差异会导致环境因子的不同,环境因子与蝗虫的生长发育也息息相关。因此,为研究不同地理分布的环境因素与蝗虫肠道菌群之间的关系,在国家气象数据中心下载到东亚飞蝗采集地的5年平均气相数据并进行分析(表4)。其中,平均气温(mean temperature)的代号为T;降水量(precipitation)的代号为P;相对

表4 不同地理分布2017–2020年平均气象条件数据统计

Table 4 Statistics on the average meteorological conditions from 2017 to 2020 for different geographical locations

Sample	T/°C	P (mm)	RH (%)	SUN (h)	WVEL (m/s)	EVA (mm)	Pa (hpa)	GND (°C)
GQ	22.42	2 053.36	78.6	1 607	2.92	26 223	1 004.18	24.16
HC	13.92	528.52	60.4	2 565	2.16	32 766	1 016.16	16.02
SD	14.56	754.32	60.4	2 701	1.90	32 766	1 016.48	15.86
YK	16.08	1 063.78	70.8	2 482	2.24	19 674	810.98	19.00

湿度(relative humidity)的代号为 RH; 日照时数(sunshine duration)的代号为 SUN; 风速(wind velocity)的代号为 WVVEL; 蒸发量(evaporation)的代号为 EVA; 平均气压(pressure)的代号为 Pa; 地面温度(ground temperature)的代号为 GND。结果如图 4 所示, α 多样性中的 Goods-coverage 指数与环境因子的平均温度和降水量显著相关, 这说明平均温度和降水量可能会影响东亚飞蝗肠道菌群的多样性。

在门的分类阶元水平上, 温度和降水量与东亚飞蝗肠道微生物中的蓝细菌门显著相关(图 5)。日照时数、风速和地面温度与变形菌门与厚壁菌门等显著相关。平均气压与变形菌门、厚壁菌门、弯曲杆菌门(*Campilobacterota*)和互

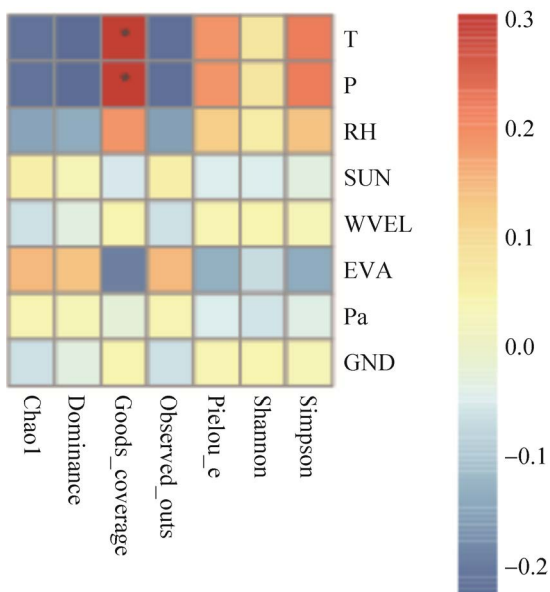


图 4 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析

Figure 4 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations. T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVVEL: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

养菌门(*Synergistota*)显著相关。相对湿度与蒸发量与东亚飞蝗肠道菌群主要的 35 个菌群没有相关性。

在纲的分类阶元水平上, 温度和降水量与东亚飞蝗肠道微生物中的蓝细菌纲显著相关(图 6)。日照时数、风速和地面温度与芽孢杆菌纲和 γ -变形菌纲等显著相关。蒸发量与芽孢杆菌纲显著相关。平均气压与 γ -变形菌纲和芽孢杆菌纲显著相关。

在目分类阶元水平上, 温度和降水量与东亚飞蝗肠道微生物中的芽孢杆菌纲、立克次氏体目(*Rickettsiales*)和微球菌目(*Micrococcales*)显著相关(图 7)。日照时数、风速和地面温度与乳杆菌目、肠杆菌目、伯克氏菌目、芽孢杆菌目、微球菌目、棒状菌目(*Corynebacteriales*)和弧菌目(*Vibrionales*)等显著相关。相对湿度和蒸发量与芽孢杆菌目、微球菌目、棒状菌目及弧菌目显著相关。平均气压与乳杆菌目、肠杆菌目、芽孢杆菌目、微球菌目、弧菌目和根瘤菌目显著相关。

在科分类阶元水平上(图 8), 温度和降水量与东亚飞蝗肠道微生物中的乳杆菌科、肠杆菌科、微球菌科(*Micrococcaceae*)、拜叶林克式菌科(*Beijerinckiaceae*)、摩根菌科(*Morganellaceae*)、莫拉菌科(*Moraxellaceae*)、动球菌科(*Planococcaceae*)和 *Mitochondria* 显著相关。日照时数和风速与肠球菌科、链球菌科、乳杆菌科、*Yersiniaceae*、拜叶林克式菌科、摩根菌科、动球菌科、丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)、棒状菌科(*Corynebacteriaceae*)和伯克氏菌科(*Burkholderiaceae*)显著相关。相对湿度和蒸发量与链球菌科、乳杆菌科、肠杆菌科、拜叶林克式菌科、摩根菌科、动球菌科、棒状菌目、微球菌科、*Yersiniaceae* 和伯克氏菌科显著相关。平均气压与链球菌科、肠杆菌科、

乳杆菌科、螺原体科、*Yersiniaceae*、拜叶林克式菌科、摩根菌科、动球菌、丛毛单胞菌科和伯克氏菌科显著相关。地面温度与链球菌科、

肠杆菌科、乳杆菌科、*Yersiniaceae*、拜叶林克式菌科、摩根菌科、动球菌科、丛毛单胞菌科、棒状菌目和伯克氏菌科显著相关。

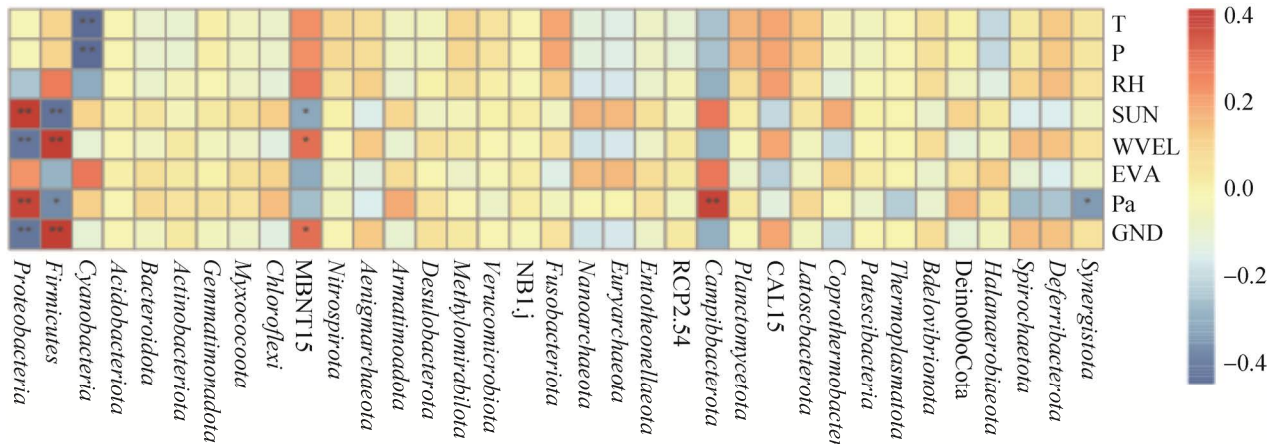


图 5 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析(门水平)

Figure 5 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations (phylum level). T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVLE: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

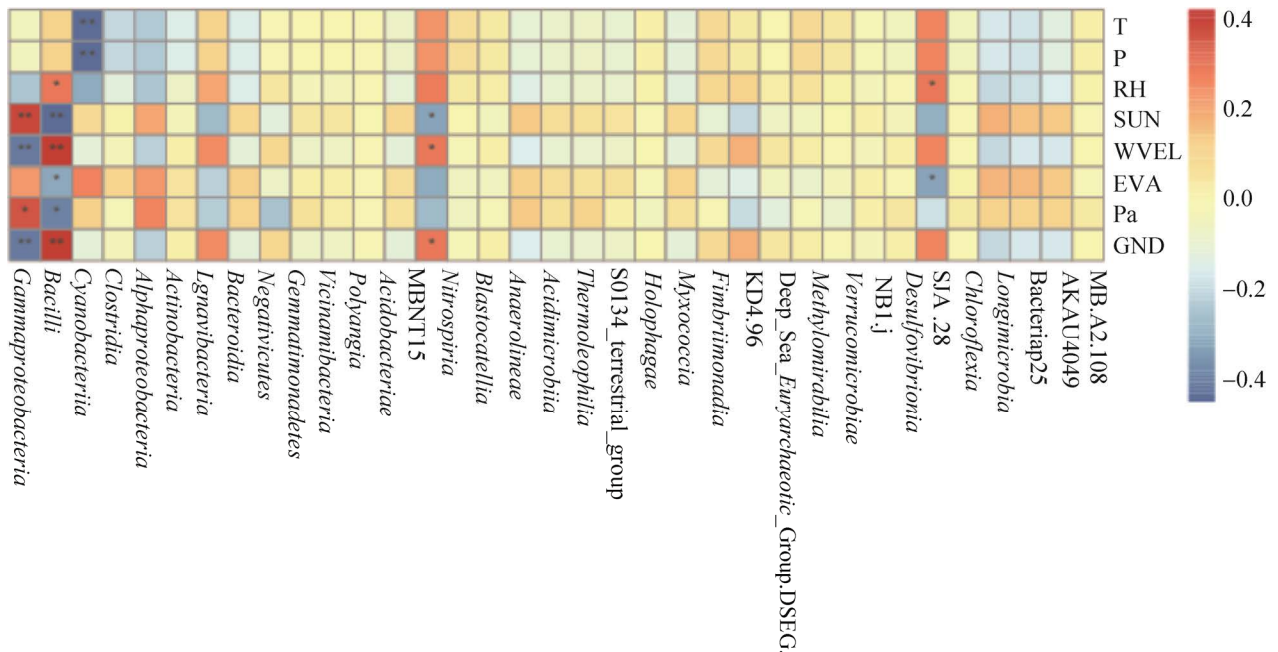


图 6 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析(纲水平)

Figure 6 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations (class level). T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVLE: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

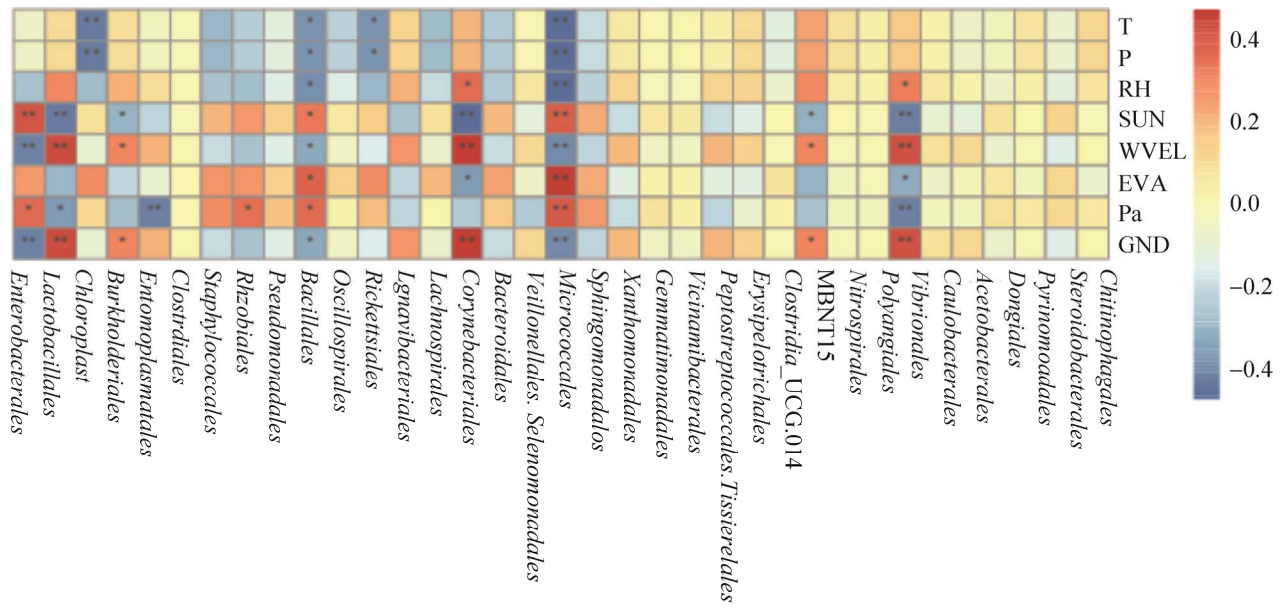


图 7 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析(目水平)

Figure 7 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations (order level). T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVEL: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

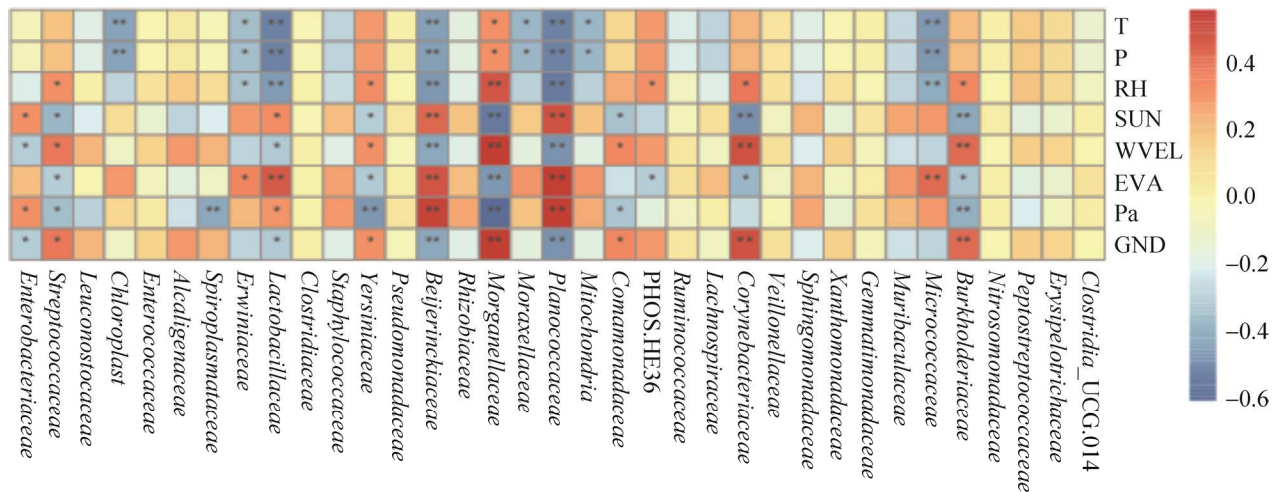


图 8 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析(科水平)

Figure 8 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations (family level). T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVEL: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

在属分类阶元水平上(图 9), 温度和降水量与东亚飞蝗肠道微生物中的泛菌属、乳酸杆菌

属、沙雷氏菌属(*Serratia*)、*Methylobacterium*、*Methylorubrum*、不动杆菌(*Acinetobacter*)、

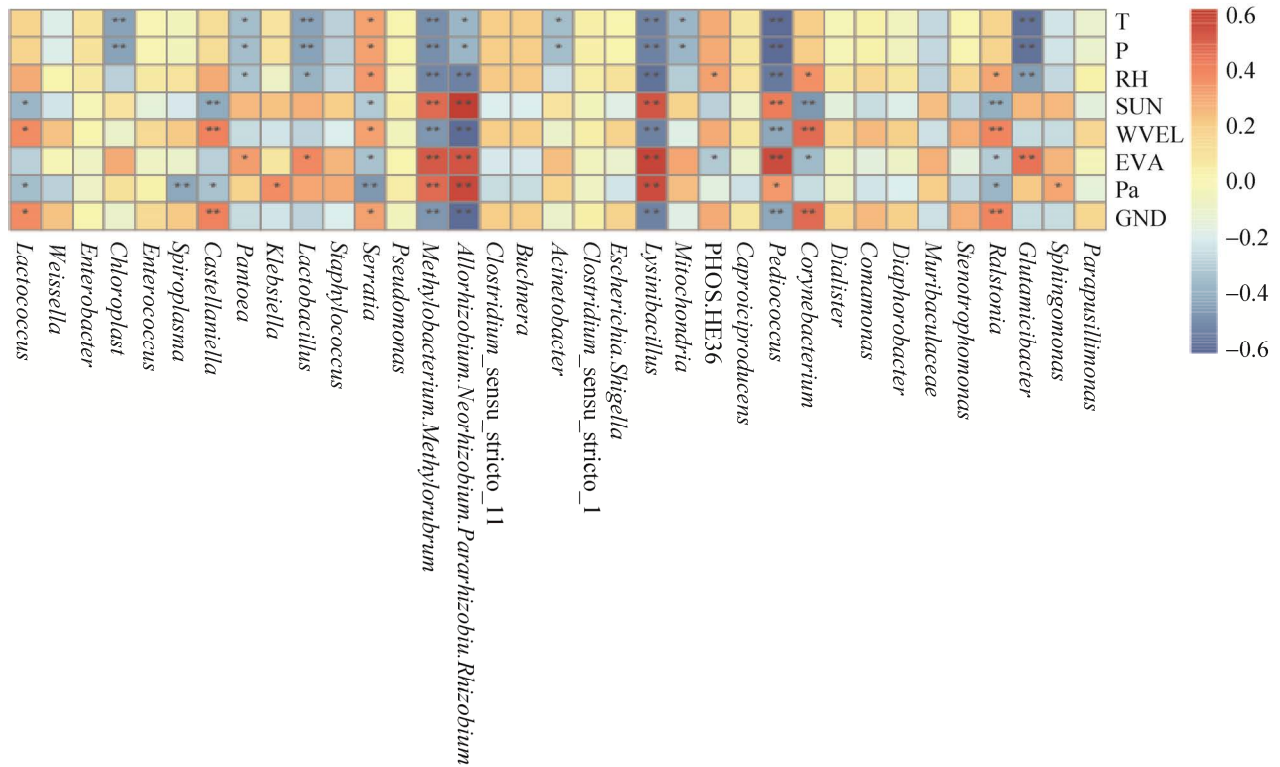


图9 不同地理种群东亚飞蝗肠道微生物的环境因子分析(属水平)

Figure 9 Analysis of environmental factors of *Locusta migratoria manilensis* Meyen gut microbes in different geographical populations (genus level). T: Mean temperature; P: Precipitation; RH: Relative humidity; SUN: Sunshine duration; WVEL: Wind velocity; EVA: Evaporation; Pa: Pressure; GND: Ground temperature.

Allorhizobium. *Neorhizobium*. *Pararhizobium*. *Rhizobium*、赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*)、*Mitochondria*、小球菌(*Pediococcus*)及*Glutamicibacter*显著相关。日照时数、风速、地面温度与乳球菌属、反硝化卡斯特兰尼氏菌、*Methylobacterium*. *Methylorubrum*、*Allorhizobium*. *Neorhizobium*. *Pararhizobium*. *Rhizobium*、赖氨酸芽胞杆菌属、小球菌、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、青枯菌属(*Ralstonia*)和沙雷氏菌属显著相关。相对湿度和蒸发量与泛菌属、乳酸杆菌属、沙雷氏菌属、*Methylobacterium*. *Methylorubrum*、*Allorhizobium*. *Neorhizobium*. *Pararhizobium*. *Rhizobium*、赖氨酸芽胞杆菌属、小球菌、

Glutamicibacter、棒状杆菌属及青枯菌属显著相关。

3 讨论与结论

昆虫在长期进化过程中，与肠道微生物形成了长期共生关系，寄主选择和繁殖等行为也受到肠道微生物的影响^[12-13]。本文研究结果显示，不同地理、性别和发育时期的东亚飞蝗肠道内微生物多样性与丰富度不同。其中，分布区域的影响最为显著，其次为性别与发育时期因素。本文虽然在样品采集方面存在一定局限，但每个地区有一定的采集数量，且随机选取，设置多个重复，以消除个体差异，结果也说明

了不同地区东亚飞蝗肠道微生物的差异, 以及环境对其肠道微生物多样性的影响。研究报道显示蝗灾的发生与降水和温度密切相关^[14], 在我国北部草原地区, 气候潮湿、热量相对较少, 干旱引发的高温可以促进蝗虫的发育; 在气温相对较高的沙漠化地区, 降水量的适度增加与蝗灾的发生呈正相关^[15-16]。本研究所选取的 8 个环境因子中对东亚飞蝗肠道微生物影响最大的也为平均温度和降水量。

对比不同分布区域的东亚飞蝗, 结果显示广东省清远市和河北省沧州市的肠道微生物多样性差异最大, 其原因可能与两地的地理环境因素及食料不同有关。有研究表明, 宿主昆虫栖息地在不同的环境条件下, 会影响栖居于昆虫肠道内的共生微生物与其宿主之间的相互作用, 进而微生物的种类及分布也会受到影响^[17-18]。广东省属于亚热带季风气候, 日照时间长、雨量充沛和物产丰富, 而河北省属于温带大陆性季风气候, 降水不均、日照时数较短和种植作物较为单一, 推测栖息地和食料的不同导致两地的东亚飞蝗肠道微生物有所差异。对比不同性别的东亚飞蝗, 结果显示雌雄蝗虫的肠道菌群属水平组成差异显著, 与刘玉升等^[19]对东亚飞蝗肠道细菌的研究结果相似。虽然目前已有研究表明不同性别的昆虫其体内微生物多样性与丰度存在差异^[20], 但有关东亚飞蝗的雌雄虫肠道微生物差异性机理还少有研究。对比不同发育阶段的东亚飞蝗可以看出, 幼虫和成虫时期肠道微生物群落差异很大, 其原因推测为蝗虫在达到成虫阶段前需要经过多次蜕皮, 形态结构甚至器官系统均发生了巨大变化, 因此在一定程度上影响了微生物群落组成^[21-22]。

蝗灾发生的前提是个体大规模聚群, 然后迁飞扩散造成危害。蝗虫群居型特征是造成暴

发成灾的特征之一, 而迁飞则是蝗灾面积扩大的重要因素^[23]。研究表明蝗虫的肠道微生物与聚集信息素的合成与释放密切相关^[24-25], 明确肠道微生物对其生命活动和生理代谢的影响具有重要意义。根据现有的文献记载, 影响东亚飞蝗肠道微生物的体内外各种不同环境因素中, 对于食料和栖息地环境等外界影响因素的研究较多^[26-27], 较少研究是关于揭示气候变化对蝗虫肠道微生物的作用机制。由于蝗虫生长繁殖与其肠道微生物呈现高度相关关系, 有必要在未来研究中开展更多非生物因子变化对蝗虫肠道微生物影响的实验研究。本文则通过分析我国不同分布地区东亚飞蝗肠道微生物的多样性和环境因子与蝗虫肠道微生物的相关性, 为蝗虫溯源及防蝗微生物制剂提供了理论依据。

消化道的微生态系统平衡由宿主、微生物菌群及环境共同维持, 它是微生物菌群与其宿主在不同发育阶段动态的生理组合, 是微生物菌群与宿主相互依赖、相互制约的动态平衡的具体体现^[28]。任何一种生物均是自然生态系统的一部分, 蝗虫肠道微生物是蝗虫与自然环境的直接反映者, 加强肠道微生物的研究是建立蝗虫可持续综合防控的关键环节, 未来应在遵循自然规律的基础上, 集成基础研究、应用技术研究和生态管理 3 个层面, 建立全链条可持续防控蝗灾的新技术体系。

参考文献

- [1] 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).
- [2] 易齐. 种类最多的动物: 昆虫[J]. 植保技术与推广,

- 1994, 14(5): 22.
- YI Q. Most kinds of animals-insects[J]. *Plant Protection Technology and Extension*, 1994, 14(5): 22 (in Chinese).
- [3] 白竞. 5种蝗虫肠道微生物多样性分析及纤维素分解菌的分离鉴定[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2021.
- BAI J. Analysis of intestinal microbial diversity of five species of grasshoppers and isolation and identification of cellulose degrading bacteria[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2021 (in Chinese).
- [4] 杭苏琴. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道微生物的影响[D]. 南京农业大学博士学位论文, 2007.
- HANG SQ. Effects of Mannan-oligosaccharide on the gastro-intestinal bacteria of weaning piglets[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [5] FISCHER CN, TRAUTMAN EP, CRAWFORD JM, STABB EV, HANDELSMAN J, BRODERICK NA. Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence *Drosophila* behavior[J]. *eLife*, 2017, 6: e18855.
- [6] 鲁迎新, 刘彦群, 李群, 夏润玺, 王欢. 昆虫肠道微生物多样性研究进展[J]. *河南农业科学*, 2016, 45(11): 1-7.
- LU YX, LIU YQ, LI Q, XIA RX, WANG H. Research progress on intestinal microbial diversity of insects[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(11): 1-7 (in Chinese).
- [7] DILLON RJ, WEBSTER G, WEIGHTMAN AJ, CHARNLEY AK. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 97(1): 69.
- [8] SU LJ, LIU H, LI Y, ZHANG HF, CHEN M, GAO XH, WANG FQ, SONG AD. Cellulolytic activity and structure of symbiotic bacteria in locust guts[J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2014, 13(3): 7926-7936.
- [9] 徐冲, 钟丽娟, 陈丽媛, 陈杰, 孙翠焕, 朱巍巍, 关艳丽. 东亚飞蝗肠道内高产纤维素酶菌株筛选及鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(3): 69-72.
- XU C, ZHONG LJ, CHEN LY, CHEN J, SUN CH, ZHU WW, GUAN YL. Screening and identification of high-yielding cellulase strain from enteric duct in east Asian locust *Locusta migratoria manilensis* Meyen[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(3): 69-72 (in Chinese).
- [10] DILLON RJ, VENNARD CT, BUCKLING A, CHARNLEY AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion[J]. *Ecology Letters*, 2005, 8(12): 1291-1298.
- [11] 孟涛, 任炳忠. 蝗虫资源开发与利用的研究进展[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2002, 3(6): 485-490.
- MENG T, REN BZ. The research advance of developing and utilization of the grasshopper resource[J]. *Journal of Beihua University: Natural Science*, 2002, 3(6): 485-490 (in Chinese).
- [12] BRODERICK NA, LEMAITRE B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 307-321.
- [13] 程代凤, 李慧静, 陆永跃. 微生物对昆虫行为的影响研究进展[J]. *昆虫学报*, 2021, 64(6): 743-756.
- CHENG DF, LI HJ, LU YY. Research progress of the influence of microorganisms on insect behavior[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64(6): 743-756 (in Chinese).
- [14] 任炳忠, 张雪. 中国的蝗灾及防控对策[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(2): 127-131.
- REN BZ, ZHANG X. History and controlling strategy of locust plague in China[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2013, 35(2): 127-131 (in Chinese).
- [15] 方毅才. 甘肃草原蝗虫现状与防治对策[J]. *草业科学*, 2009, 26(11): 157-160.
- FANG YC. The occurrence and control situation of grassland locusts in Gansu province[J]. *Pratacultural Science*, 2009, 26(11): 157-160 (in Chinese).
- [16] 张雪, 苗会, 付志欣, 韩叶, 王贵强, 任炳忠. 东北亚洲飞蝗发生区生态环境特征研究: 以吉林省为例[J]. *吉林农业大学学报*, 2012, 34(5): 522-526.
- ZHANG X, MIAO H, FU ZX, HAN Y, WANG GQ, REN BZ. The ecological-environment characters of *Locusta migratoria manilensis* Meyen Linnaeus plague area in northeast China[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2012, 34(5): 522-526 (in Chinese).
- [17] SCHMID RB, LEHMAN RM, BROZEL VS, LUNDGREN JG. Gut bacterial symbiont diversity within beneficial insects linked to reductions in local biodiversity[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2015, 108(6): 993-999.
- [18] DONKERSLEY P, RHODES G, PICKUP RW, JONES KC, POWER EF, WRIGHT GA, WILSON K. Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition[J]. *Oecologia*, 2017, 185(4): 749-761.
- [19] 刘玉升, 李明立, 刘俊展, 郑继法. 东亚飞蝗肠道细

- 菌的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 34-36, 39.
- LIU YS, LI ML, LIU JZ, ZHENG JF. Study on the intestinal bacteria in *Locusta migratoria manilensis* Meyen[J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 19(1): 34-36, 39 (in Chinese).
- [20] 赵辉, 张帅, 雒珺瑜, 张利娟, 王爱英, 崔金杰. 16S rDNA 克隆文库方法分析中华通草蛉共生细菌组成[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(6): 849-856.
- ZHAO H, ZHANG S, LUO JY, ZHANG LJ, WANG AY, CUI JJ. Analysis of endophytic symbiotic bacterial composition in *Chrysoperla sinica* (tjeder) adults with 16S rDNA clone library[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(6): 849-856 (in Chinese).
- [21] 曹乐, 宁康. 昆虫肠道的宏基因组学: 微生物大数据的新疆界[J]. 微生物学报, 2018, 58(6): 964-984.
- CAO A, NING K. Metagenomics of insect gut: new borders of microbial big data[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(6): 964-984 (in Chinese).
- [22] 周帆, 庞志倡, 余小强, 汪肖云. 昆虫肠道微生物的研究进展和应用前景[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(3): 600-607.
- ZHOU F, PANG ZC, YU XQ, WANG XY. Insect gut microbiota research: progress and applications[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2020, 57(3): 600-607 (in Chinese).
- [23] 朱慧, 任炳忠. 蝗虫成灾规律、影响因素及防控技术研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(3): 520-528.
- ZHU H, REN BZ. Research advances in occurrence regulation, influential factors, and efficient control of grasshoppers and locusts[J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(3): 520-528 (in Chinese).
- [24] SHI WP, GUO Y, XU C, TAN SQ, MIAO J, FENG YJ, ZHAO H, ST LEGER RJ, FANG WG. Unveiling the mechanism by which microsporidian parasites prevent locust swarm behavior[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(4): 1343-1348.
- [25] HUNT J, CHARNLEY AK. Abundance and distribution of the gut flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1981, 38(3): 378-385.
- [26] 贺新华, 刘玉升, 郑继法. 不同食料植物对东亚飞蝗肠道细菌状况的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(6): 492-497.
- HE XH, LIU YS, ZHENG JF. Effects of different feeding plants on the intestinal bacteria of *Locusta migratoria manilensis*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(6): 492-497 (in Chinese).
- [27] 石旺鹏. 不同来源飞蝗后肠微生物群落高通量测序分析[J]. 生物资源, 2017, 39(4): 298-302.
- SHI WP. Analysis on high throughput sequencing of hindgut microflora of *Locusta migratoria* from different sources[J]. Biotic Resources, 2017, 39(4): 298-302 (in Chinese).
- [28] 康白, 袁杰利. 微生态学应重视共生生理学的研究方向[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(4): 189-193, 195.
- KANG B, YUAN JL. Microecology should pay attention to the research direction of symbiotic physiology[J]. Chinese Journal of Microecology, 2003, 15(4): 189-193, 195 (in Chinese).