

谷蠹幼虫和成虫体内微生物多样性差异分析*

陈彤彤^{1,2**} 薛丁榕^{2**} 吕建华¹ 夏丽媛² 伍祎^{2***}

(1. 河南工业大学粮食和物资储备学院, 粮食储藏安全河南省协同创新中心, 郑州 450001;

2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 粮食储运国家工程研究中心, 北京 100037)

摘要 【目的】探究重要储粮害虫谷蠹 *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) 幼虫和成虫体内微生物群落组成及多样性。【方法】利用 Illumina NovaSeq 高通量测序技术对谷蠹体内细菌 16S rDNA 的 V3-V4 变异区和真菌 ITS 的 ITS1 区进行高通量测序分析。【结果】从谷蠹幼虫和成虫样本中分别得到细菌 16S rDNA 基因序列有效数据为 256 551 条和 249 101 条, 分别聚类到 214 个 OTUs 和 251 个 OTUs; 幼虫和成虫体内真菌 ITS 有效数据分别为 196 246 条和 109 184 条, 分别聚类到 547 个 OTUs 和 963 个 OTUs。谷蠹体内细菌优势菌属是 Flavobacteriales endosymbiont of *Rhyzopertha dominica* (FERD), 在幼虫和成虫中占比分别为 63.77% 和 88.28%。谷蠹体内丰度最高的真菌是链格孢属 *Alternaria*, 在幼虫和成虫中占比分别为 44.62% 和 7.10%。Alpha 多样性分析结果显示, 幼虫和成虫体内微生物多样性指数存在显著差异, 但丰富度指数无显著差异。Beta 多样性分析结果显示, 谷蠹体内微生物群落在幼虫和成虫之间存在显著差异。【结论】谷蠹幼虫和成虫体内微生物群落组成存在显著差异, 幼虫体内细菌多样性高于成虫, 真菌多样性低于成虫。研究结果为“抑菌治虫”的储粮害虫生物防控新技术开发奠定基础, 也为揭示共生菌与谷蠹环境适应性研究奠定基础。

关键词 谷蠹; 微生物; 多样性; 幼虫; 成虫; 高通量测序

Differences in microbial diversity between larval and adult *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrycidae)

CHEN Tong-Tong^{1,2**} XUE Ding-Rong^{2**} LÜ Jian-Hua¹ XIA Li-Yuan² WU Yi^{2***}

(1. Henan Collaborative Innovation Center for Grain Storage Security, School of Food and Strategic Reserves, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. National Engineering Research Center of Grain Storage and Logistics, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract [Objectives] To investigate the microbial composition of larvae and adults of the important stored grain pest *Rhyzopertha dominica* (Fabricius). [Methods] The Illumina NovaSeq high-throughput sequencing platform was used to sequence the V3-V4 fragment of the bacterial 16S rDNA gene and the ITS1 fragment of the fungal ITS gene in larvae and adults of *R. dominica*. [Results] Valid reads of 16S rDNA from larvae and adults were 256 551 and 249 101, which were clustered to 214 and 251 OTUs, respectively. Valid ITS reads from larvae and adults were 196 246 and 109 184, which were clustered to 547 and 963 OTUs, respectively. The Flavobacteriales endosymbiont of *R. dominica* (FERD) was the dominant bacterial genus in *R. dominica*, comprising for 63.77% of the larval, and 88.28% of the adult, microbiome, respectively. *Alternaria* was the most abundant fungus, comprising for 44.62% of the larval, and 7.10% of the adult, microbiome, respectively. Alpha diversity analysis showed that there is a significant difference in the microbial diversity index of larvae and adults, but no significant difference in the richness index. Beta diversity analysis indicates that there is a significant difference between the larval and adult microbiome. [Conclusion] There are significant differences between the microbiomes of larval and adult *R. dominica*. Larvae had higher bacterial diversity, but lower fungal diversity, than adults. This study lays a

*资助项目 Supported projects: 国家粮食和物资储备局科学研究院自主选题 (JY2306; JY2102; JY2003)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: tongtchen@163.com; xdr@ags.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuyi@ags.ac.cn

收稿日期 Received: 2022-01-26; 接受日期 Accepted: 2022-08-22

foundation for the development of novel control technologies for stored grain pests based on “inhibiting microorganisms to control pests”, and research on the environmental adaptability of symbionts in *R. dominica*.

Key words *Rhyzopertha dominica*; microorganisms; diversity; larva; adult; high-throughput sequencing

谷蠹 *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) 隶属于鞘翅目 Coleoptera, 长蠹科 Bostrichidae, 是一种重要的蛀食性储粮害虫, 主要分布在热带和亚热带地区, 在高温高湿地区危害严重, 且有很强的耐热耐干旱能力 (Longstaff, 1999; 权跃等, 2010; 李丹丹等, 2021; Perkin *et al.*, 2021)。幼虫和成虫都有发达的上颚, 可以蛀食完整的粮粒, 被危害过的粮食重量减轻, 发芽率降低, 且容易产生次级害虫和真菌感染。成虫飞翔能力强, 可通过门、窗、通风道以及仓房裂缝等部位进入粮仓, 是最难防治的储粮害虫之一 (周国磊等, 2018)。磷化铝化学熏蒸是防治谷蠹最快速有效的方法, 但长期不合理使用引起了害虫抗药性、环境污染和安全等问题 (Opit *et al.*, 2012), 粮食行业正积极寻找绿色、生态、低碳的害虫防治技术。

昆虫体内有大量微生物, 参与昆虫的各种生命活动 (Bertino-Grimaldi *et al.*, 2013; Scully *et al.*, 2014; Consuegra *et al.*, 2020), 同时它们也会受到宿主昆虫的调节, 随着宿主生理需求和所处的外界环境的变化而变化。虫态是影响昆虫体内微生物组成和多样性的重要因素之一。米象 *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) 体内的内共生菌感染密度在成虫羽化后迅速增加, 这是由于成虫羽化后外表皮的形成需要大量氨基酸, 而共生菌可以为宿主提供氨基酸, 不感染内共生菌的米象成虫表皮更薄、颜色更浅 (Vigneron *et al.*, 2014)。*Wolbachia* 在杂拟谷盗 *Tribolium confusum* 成虫体内的感染密度显著高于幼虫 (苗世远, 2017)。暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 1 龄幼虫肠道优势菌是拟杆菌门, 2 龄和 3 龄幼虫肠道优势菌是厚壁菌门 (Huang and Zhang, 2013)。大分舌蜂 *Colletes gigas* 低龄幼虫、高龄幼虫和滞育预蛹期肠道共生细菌的组成有显著变化 (寇若攻等, 2021)。

昆虫体内微生物包括细菌和真菌, 目前对细

菌的研究较为深入, 蚜虫体内的 *Buchnera* 可以为蚜虫提供氨基酸 (Moran and Degnan, 2006)。*Wolbachia* 在节肢动物中的感染率很高, 对宿主昆虫的生殖有调控作用, 可以诱导宿主胞质不融合, 引起雄性致死效应 (Serbus *et al.*, 2008; Zug and Hammerstein, 2012; 朱翔宇等, 2020)。果蝇的两种肠道共生菌植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 和醋杆菌 *Acetobacter pomorum* 在代谢功能上互利, 共同为宿主提供代谢物质, 可以维持宿主在低营养条件下正常生长 (Consuegra *et al.*, 2020)。真菌也参与昆虫的生命活动, 类酵母共生菌 Yeast-like symbiontes 可以为褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 提供必须氨基酸, 还可以提供麦角固醇合成的中间物, 参与宿主合成固醇类物质, 保证宿主正常生长发育 (Noda and Omura, 1992; Noda and Koizumi, 2003; 王国超等, 2005)。

谷蠹作为重要储粮害虫, 有关其体内微生物的研究处于起步阶段。Okuded 等 (2017) 研究发现谷蠹体内存在一种胞内共生菌 Flavobacteriales endosymbiont of *Rhyzopertha dominica* (本文缩写为 FERD), 属于拟杆菌门, 拟杆菌纲, 黄杆菌目, 根据全长 16S rDNA 序列分析确定为新种, 具体功能尚不清楚。此外, 谷蠹体内发现的 FERD 在幼虫和成虫体内的相对丰度是否变化, 谷蠹体内微生物群落结构与多样性尚不清楚。因此本研究采用高通量测序技术, 对谷蠹幼虫和成虫体内的细菌和真菌进行鉴定和多样性分析, 研究谷蠹幼虫和成虫体内细菌和真菌群落组成、多样性和差异。研究结果可以为后续研究谷蠹体内微生物的生态功能以及开发基于“抑菌治虫”的防控新技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及试虫处理

谷蠹来源于国家粮食和物资储备局科学研

究院粮食储运研究所实验室, 2016 年采自浙江温州, 以洗净的小麦为饲料, 置于温度为 27 °C, 相对湿度为 65% 的人工智能培养箱 (HPP750, memmert, 德国) 中饲养。用 2.5 mm 分选筛从小麦粒中筛选出成虫, 取 25 头成虫经过 12 h 饥饿处理, 置于无菌操作台上用 75% 酒精体表消毒 3 min, 重复 3 次, 再用无菌水漂洗 3-5 次, 晾干水分后将虫体装入 2 mL 的离心管中, 液氮速冻。每个样品 5 头成虫, 共 3 个重复。解剖小麦获得幼虫, 体表消毒操作与成虫一致, 每个幼虫样品 50-60 头, 共 3 个重复。

1.2 总 DNA 提取与检测

按照 TIANGEN 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (DP304, 天根生化科技(北京)有限公司, 中国) 说明书提取成虫和幼虫的总 DNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果, 取适量 DNA 于离心管中, 将 DNA 稀释至 1 ng/ μ L, 用于后续 PCR 扩增。

1.3 基因片段扩增、文库构建与测序

以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用细菌 16SV3-V4 区引物 (341F 和 806R) 和真菌 ITS1 区引物 (ITS1F 和 ITS2-2043R) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 10 μ L, Phusion Master Mix (2 \times) 15 μ L (M0531S, NEB, 美国), 正反引物各 1 μ L, 补充 ddH₂O 至 30 μ L。PCR 扩增程序: 98 °C 预变性 1 min, 30 个循环 (98 °C 变性 10 s; 50 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s), 最后 72 °C 延伸扩增 5 min。PCR 产物根据浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳切割目的条带, 对目的条带使用 Universal DNA 纯化回收试剂盒 (DP214, 天根生化科技(北京)有限公司, 中国) 进行回收。使用 NEB Next® Ultra DNA Library Prep Kit 文库试剂盒 (E7370L, NEB, 美国) 进行文库构建, 使用 NovaSeq 6000 (Illumina, 美国) 进行上机测序, 平均测序读长 500 bp。

1.4 OTU 聚类及物种注释

去掉原始序列的标签和引物序列获得每个

样本的数据, 使用 FLASH 软件 (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对每个样本的数据进行拼接, 得到原始数据 (Raw reads), 经过过滤、质控、去除嵌合体得到最终有效数据 (Valid reads)。用 Qiime (Version 1.9.1) 软件对所有样本的有效序列以 97% 的一致性聚类为可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU), 选取 OTU 的代表序列进行物种注释。针对 16S rDNA 序列用 SILVA138 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>) 进行物种注释分析, 针对 ITS 序列用 Unite (v8.2) 数据库 (<https://unite.ut.ee/>) 进行物种注释分析, 在不同分类水平统计不同分组的群落组成, 用 SPSS 25.0 软件绘制不同分类水平物种丰度柱形图。

1.5 微生物群落多样性分析及功能预测

对各样本的数据进行均一化处理, 用于多样性分析。使用 Qiime (Version 1.9.1) 软件计算单个样本的 Alpha 多样性指数 (α 多样性指数), 包括 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、ACE 指数和 Chao1 指数。Shannon-Wiener 指数反映样本中的物种多样性和分布均匀度, 群落物种多样性越高, 分布越均匀该指数越大。Simpson 指数反映样本中微生物群落组成多样性和分布均匀度, 该指数有 3 种展示形式, 第一种是经典 Simpson 指数 (D), 第二种是 1 减经典 Simpson 指数 (1-D), 也叫 Gini-Simpson 指数, 第三种是 1/经典 Simpson 指数 (1/D), 也叫逆辛普森多样性指数 (Ruggiero *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2018; Rosenthal *et al.*, 2019)。本文选择 1 减经典 Simpson 指数 (1-D), 即 Gini-Simpson 指数展示, 群落内物种多样性越高, 分布越均匀, 指数越大 (Venturi *et al.*, 2007)。Chao1 指数评价群落中包含的物种总数, 物种总数越多该指数越大。ACE 指数评价样本中 OTU 总数, OTU 总数越多该指数越大 (Chao, 1984; Chao *et al.*, 2000)。利用 Qiime 软件计算不同样本间 Beta 距离, 在细菌和真菌水平分别进行主坐标分析 (Principal co-ordinates analysis, PCoA), 在二维坐标图中群落组成相似的样本距离越近。

细菌功能预测 PICRUSt (Phylogenetic

investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 分析是基于 Greengenes 基因数据库 (<http://greengenes.secondgenome.com/>) 中的物种进化树和每个 OTU 的代表基因序列, 基于 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库进行基因功能预测, 对比测序数据获得的物种组成信息, 推测样本中的功能基因组成, 用 SPSS 25.0 软件绘制相对丰度柱形图。

1.6 数据统计与分析

用 SPSS 25.0 软件中独立样本 *T* 检验比较谷蠹幼虫和成虫体内细菌和真菌群落 Alpha 多样性指数的差异, 在 $P=0.05$ 的水平上比较差异显著性, 用 GraphPad Prism8 软件作图。基于 Beta 距离利用多元方差分析 (Adonis) 计算幼虫和成虫体内细菌和真菌群落之间是否存在显著差异,

用 R (Version 2.15.3) 软件中 vegan 包 Adonis 函数进行计算。

2 结果与分析

2.1 谷蠹体内细菌群落组成及多样性分析

2.1.1 16S rDNA 基因 V3-V4 区序列拼接与聚类分析 谷蠹体内细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区高通量测序共得到原始序列 518 444 条, 拼接优化后有效数据为 505 652 条。在 97% 相似度水平上进行聚类, 共得到 291 个 OTUs。其中幼虫样本测序原始数据为 262 710 条, 对应优化后得到 256 551 条有效数据, 聚类到 214 个 OTUs。成虫样本测序原始数据为 255 734 条, 对应优化后得到 249 101 条有效数据, 聚类到 251 个 OTUs。成虫和幼虫共有的 OTU 数目为 174, 成虫特有 77 个, 幼虫特有 40 个 (表 1)。

表 1 谷蠹体内细菌 16S rDNA 高通量测序情况

Table 1 Basic information of high-throughput sequencing based on 16S rDNA in *Rhyzopertha dominica*

样品 Sample	原始数据 Number of raw reads	有效数据 Number of valid reads	共有 OTU 数 Number of shared OTUs	特有 OTU 数 Number of unique OTUs
RDL	262 710	256 551	174	40
RDA	255 734	249 101	174	77

RDL: 幼虫; RDA: 成虫。下表同。

RDL: Larvae; RDA: Adults. The same below.

2.1.2 谷蠹体内细菌种类组成分析 基于 OTU 的分类结果, 在各分类等级上对谷蠹幼虫和成虫体内细菌种类和相对丰度进行统计分析 (图 1)。根据 16S rDNA 注释结果在门分类阶元水平上, 谷蠹幼虫和成虫体内有拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 等 24 门细菌。拟杆菌门 (Bacteroidetes) 是谷蠹体内的第一大优势菌门, 分别占幼虫和成虫体内细菌群落组成的 64.60% 和 91.92%。幼虫和成虫共有 16 个菌门的细菌, 成虫独有 4 个门, 幼虫独有 4 个门, 幼虫和成虫独有菌门的细菌丰度偏低, 均不足 0.05%。在目分类阶元水平上, 共注释到 95 目, 包括黄杆菌目 (Flavobacteriales)、

立克次氏体目 (Rickettsiales)、伯克氏菌目 (Burkholderiales)、虫原体目 (Entomoplasmatales) 和棒状菌目 (Corynebacteriales) 等。幼虫和成虫均以黄杆菌目 (Flavobacteriales) 为优势菌目, 分别占幼虫和成虫体内细菌群落组成的 64.56% 和 91.85%。在科分类阶元水平上, 共注释到 141 科, 包括黄杆菌目未鉴定科 (Flavobacteriales fam.)、伯克氏菌科 (Burkholderiaceae)、螺原体科 (Spiroplasmataceae)、棒状菌科 (Corynebacteriaceae) 和巴斯德菌科 (Pasteurellaceae) 等。幼虫和成虫均以黄杆菌目未鉴定科 (Flavobacteriales fam.) 为主要优势菌科, 分别占幼虫和成虫体内细菌群落组成的 64.55% 和 91.79%。在属分类阶元水平上, 共注

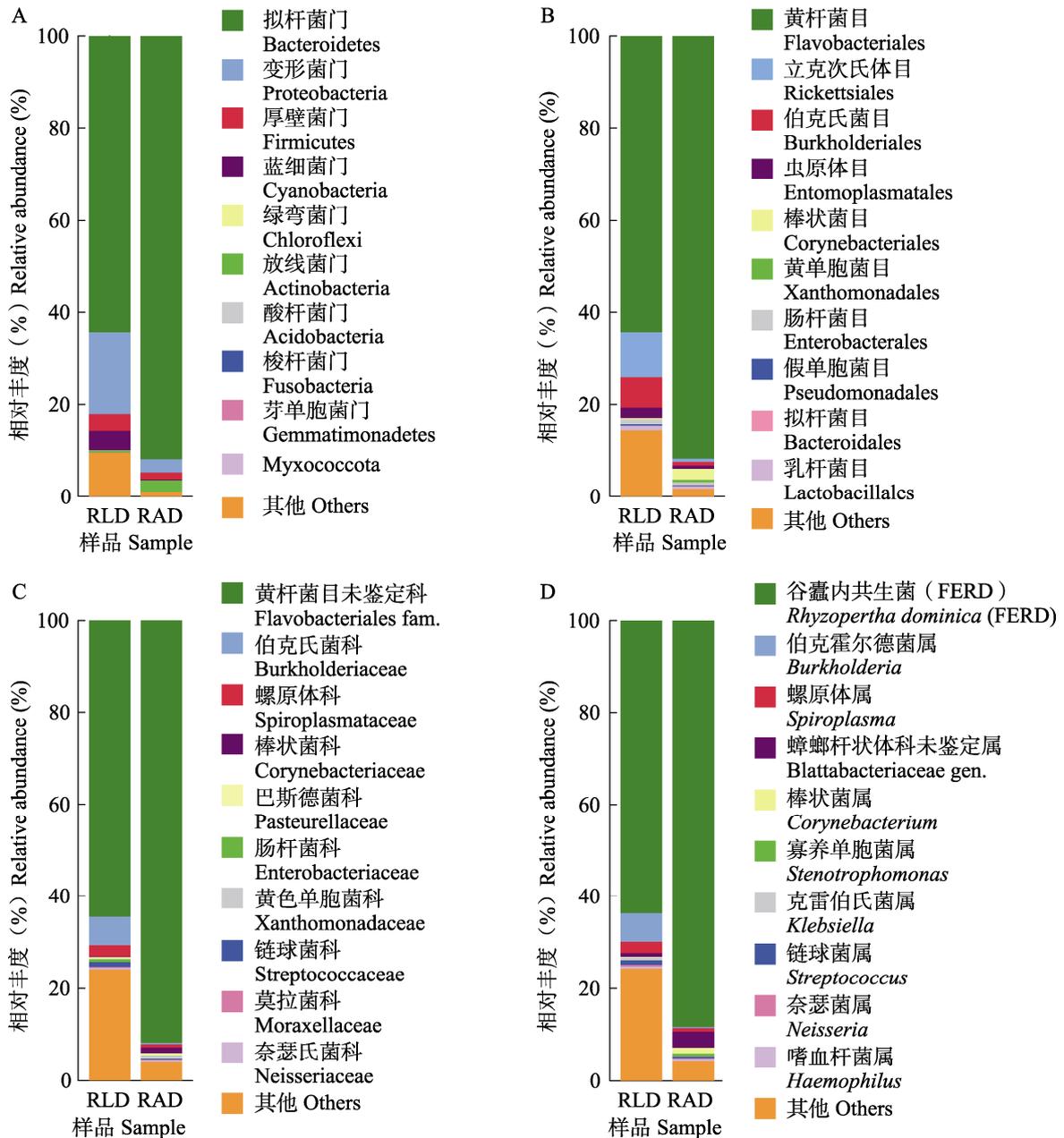


图 1 谷蠹幼虫和成虫体内细菌在门 (A)、目 (B)、科 (C) 和属 (D) 水平的相对丰度

Fig. 1 Relative abundance of the bacteria at the phylum(A), order(B), family(C) and genus(D) levels in larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

RDL: 幼虫; RDA: 成虫。下图同。

RDL: Larvae; RDA: Adults. The same below.

释到 213 属, 包括谷蠹内共生菌 FERD、伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、螺原体属 (*Spiroplasma*)、蟑螂杆状体科未鉴定属 (*Blattabacteriaceae* gen.) 和棒状菌属 (*Corynebacterium*) 等。谷蠹幼虫和成虫体内的优势菌属均为谷蠹内共生菌 FERD, 即与 Okude

等 (2017) 的研究一致, 本研究中 FERD 在幼虫体内占细菌群落组成 63.77%, 在成虫体内占 88.28%。

2.1.3 谷蠹细菌群落多样性分析 谷蠹幼虫和成虫体内细菌群落 Alpha 多样性分析结果见图 2。幼虫的 Shannon-Wiener 指数为 2.07 显著大于

成虫的 1.08 ($P=0.002$), 幼虫的 Simpson 指数为 0.55 显著大于成虫的 0.23 ($P=0.043$) (图 2: A, B), 表明幼虫比成虫体内细菌群落多样性更高, 物种分布更均匀。成虫的 ACE 指数为 257.66 大于

幼虫的 161.18 但差异不显著 ($P=0.072$), 成虫 Chao1 指数为 262.77 大于幼虫的 161.59 但差异不显著 ($P=0.073$) (图 2: C, D), 表明谷蠹成虫比幼虫体内细菌物种丰富度更高但差异不显著。

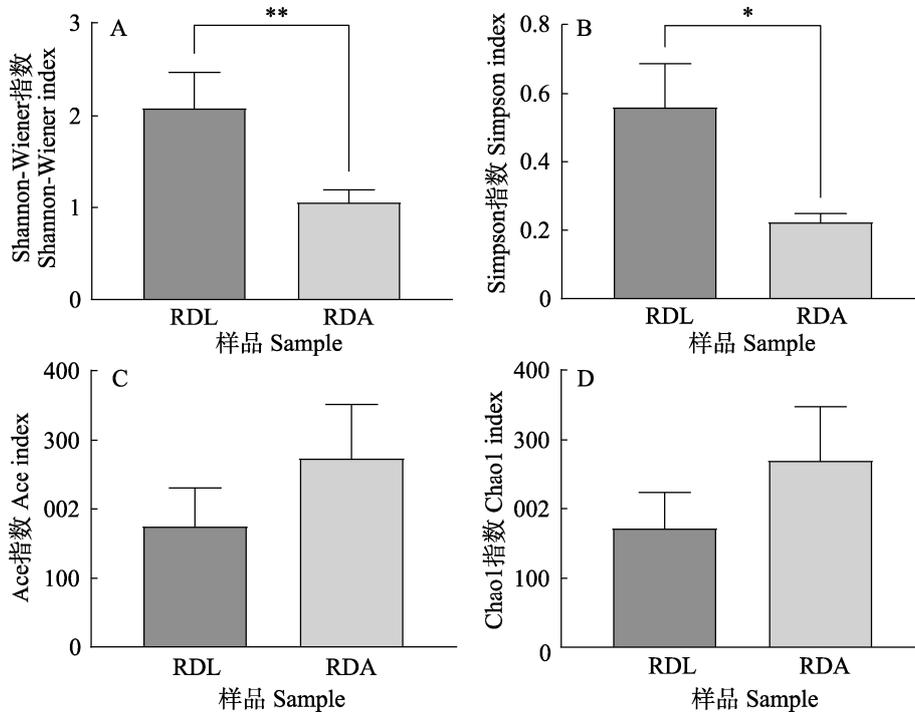


图 2 谷蠹幼虫和成虫体内细菌 α 多样性指数差异分析

Fig. 2 Variance analysis of the α -diversity index of bacteria in larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

A. Shannon-Wiener 指数; B. Simpson 指数; C. ACE 指数; D. Chao1 指数。*表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。图 6 同。

A. Shannon-Wiener index; B. Simpson index; C. ACE index; D. Chao1 index. * means significant difference ($P<0.05$), ** means extremely significant difference ($P<0.01$). The same as Fig. 6.

Beta 多样性分析结果表明, 谷蠹幼虫各样本聚集在一起, 成虫各样本聚集在一起, 显示出幼虫和成虫 2 个水平 (图 3)。进一步对组间距离进行多元方差分析, 结果显示幼虫和成虫两组间细菌群落结构存在显著差异 ($R^2=0.211$, $P=0.008$)。

2.1.4 谷蠹幼虫和成虫体内细菌功能预测 谷蠹体内细菌功能预测结果见图 4, 谷蠹体内细菌具有包括膜转运 (Membrane transport)、复制与修复 (Replication and repair)、氨基酸代谢 (Amino acid metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism)、能量代谢 (Energy metabolism)、翻译 (Translation)、辅助因子和维生素的代谢 (Metabolism of cofactors and vitamins)、核苷酸代谢 (Nucleotide metabolism)

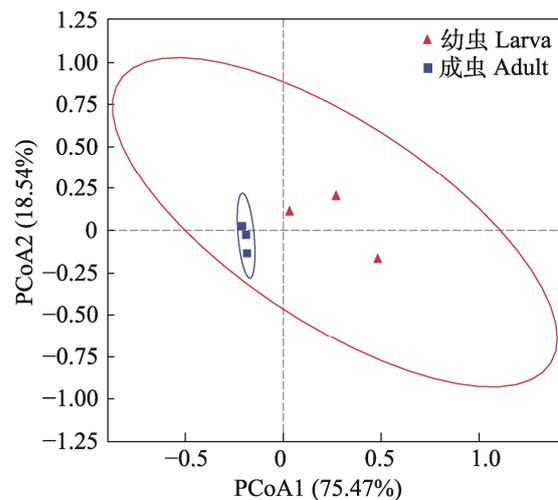


图 3 谷蠹幼虫和成虫体内细菌主坐标分析
Fig. 3 PCoA analysis of bacteria larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

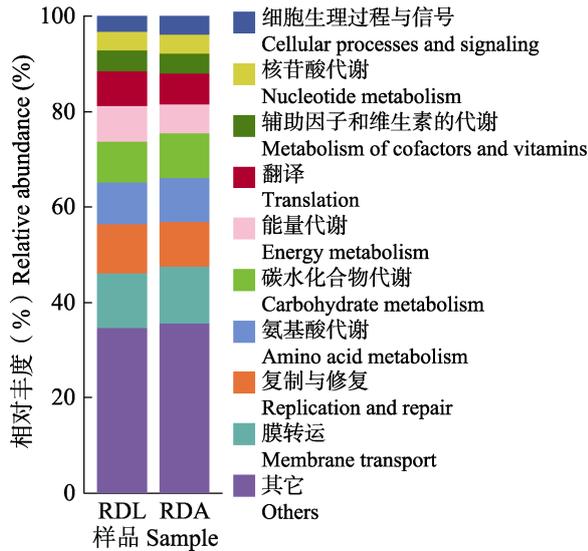


图 4 谷蠹幼虫和成虫体内细菌基因功能注释相对丰度柱形图

Fig. 4 Relative abundance and gene function annotation of the bacteria in larvae and adults of *Rhizopertha dominica*

和细胞生理过程与信号 (Cellular processes and signaling) 等功能。部分 16S rDNA 序列未在数据库中对比到相同物种或近缘种, 暂不能进行功能预测, 分类为其它。

2.2 谷蠹体内真菌群落组成及多样性分析

2.2.1 ITS1 序列拼接与聚类分析 谷蠹体内真菌 ITS 的 ITS1 高通量测序共得到原始序列 530 914 条, 拼接优化后有效数据为 305 430 条。在 97% 相似度水平上进行聚类, 共得到 963 个 OTUs。其中幼虫样本测序原始数据为 287 603 条, 对应优化后得到 196 246 条有效数据, 聚类到 547 个 OTUs。成虫样本测序原始数据为 243 311 条, 对应优化后得到 109 184 条有效数据, 聚类到 963 个 OTUs。成虫和幼虫共有的 OTU 数目为 547, 成虫特有 416 个, 幼虫无特有 OTU (表 2)。

表 2 谷蠹体内真菌 ITS1 测序情况

Table 2 Basic information of high-throughput sequencing based on ITS1 in *Rhizopertha dominica*

样本 Sample	原始数据 Number of raw reads	有效数据 Number of valid reads	共有 OTU 数 Number of shared OTUs	特有 OTU 数 Number of unique OTUs
RDL	287 603	196 246	547	0
RDA	243 311	109 184	547	416

2.2.2 谷蠹体内真菌种类组成分析 基于 OTU 的分类结果, 在各分类等级上对谷蠹幼虫和成虫真菌种类和相对丰度进行统计分析 (图 5)。在门分类阶元水平上, 谷蠹幼虫和成虫体内真菌的 ITS 基因序列共注释到 11 门, 包括子囊菌门 (Ascomycetes)、担子菌门 (Basidiomycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota) 和罗兹菌门 (Rozellomycota) 等。子囊菌门 (Ascomycetes) 是谷蠹体内的第一大优势菌门, 分别占幼虫和成虫体内真菌群落组成的 52.84% 和 11.07%。幼虫独有菌门 6 个, 分别是壶菌门 (Chytridiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)、毛霉门 (Mucoromycota)、芽枝霉门 (Blastocladiomycota)、Neocallimastigomycetes 和 Aphelidiomycota, 成虫独有 1 个菌门梳霉门 (Kickxellomycota)。在

目分类阶元水平上, 谷蠹幼虫和成虫样本共注释到 68 目, 丰度较高的目有格孢菌目 (Pleosporales)、散囊菌目 (Eurotiales)、煤炱目 (Capnodiales)、肉座菌目 (Hypocreales) 和白粉菌目 (Erysiphales) 等, 谷蠹幼虫和成虫均以格孢菌目 (Pleosporales) 为优势菌目, 分别占幼虫和成虫体内真菌群落组成的 46.71% 和 7.28%。在科分类阶元水平上, 谷蠹幼虫和成虫样本共注释到 125 科, 丰度较高的科有格孢菌科 (Pleosporaceae)、曲霉科 (Aspergillaceae)、赤壳科 (Nectriaceae)、法夫酵母科 (Phaffomycetaceae) 和巨孢衣科 (Megasperaceae) 等, 谷蠹幼虫和成虫均以格孢菌科 (Pleosporaceae) 为优势菌科, 分别占幼虫和成虫体内真菌群落组成的 44.78% 和 7.18%。在属分类阶元水平上, 谷蠹幼虫和成虫样本共注

释到 195 属, 丰度较高的属有链格孢属 (*Alternaria*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、黑团孢酶属 (*Periconia*)、枝孢属 (*Cladosporium*) 和耙菌属 (*Irpex*) 等, 谷蠹幼虫和成虫均以链格孢属

(*Alternaria*) 为优势菌属, 分别占幼虫和成虫体内真菌群落组成的 44.62% 和 7.10%。黑团孢酶属 (*Periconia*) 是幼虫独有菌属, 占幼虫体内真菌群落组成的 1.41%。

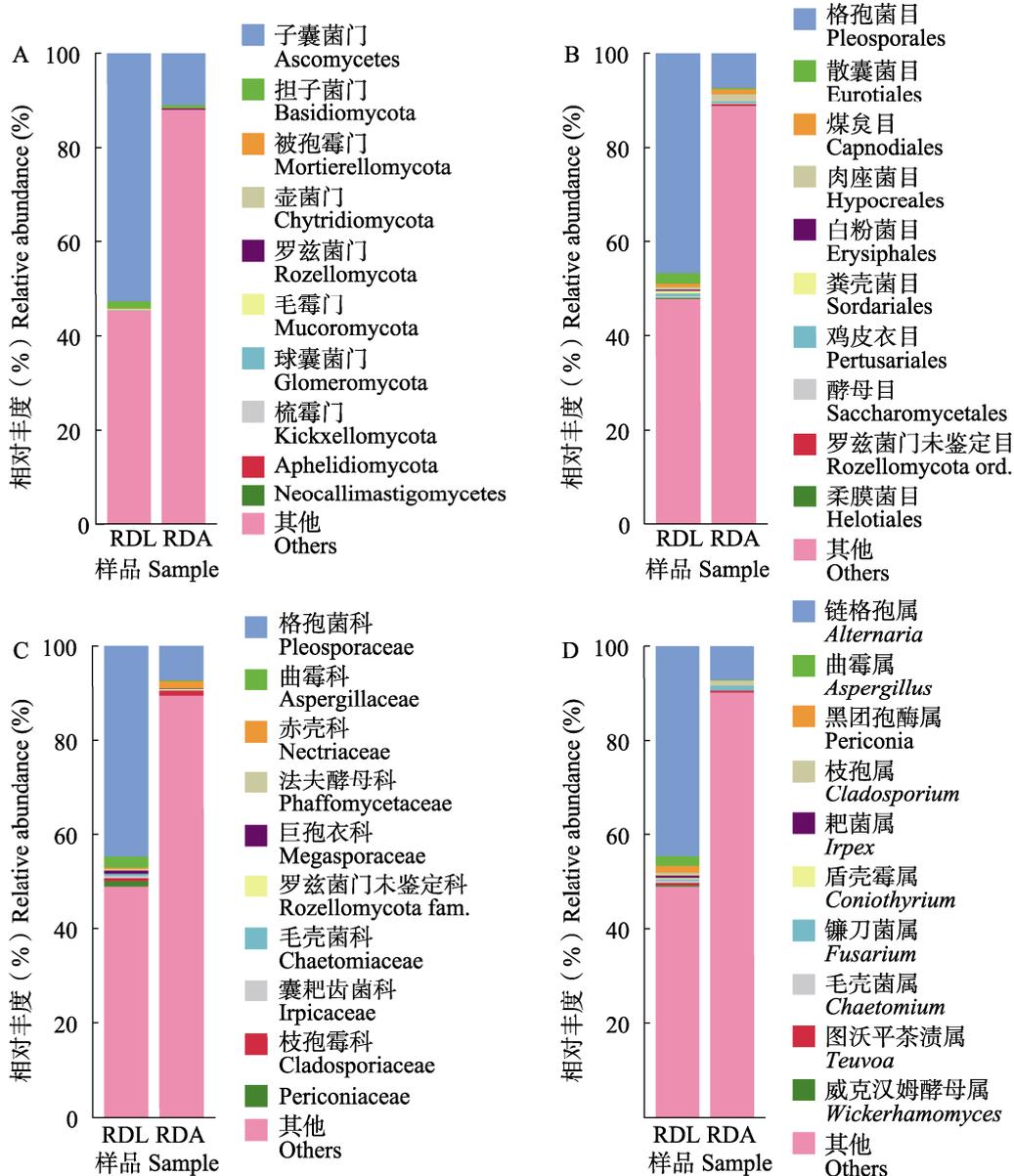


图 5 谷蠹幼虫和成虫体内真菌在门 (A)、目 (B)、科 (C) 和属 (D) 水平的相对丰度
 Fig. 5 Relative abundance of the fungus at the phylum (A), order (B), family (C) and genus (D) levels in larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

2.2.3 谷蠹真菌群落多样性分析 谷蠹幼虫和成虫体内真菌群落 Alpha 多样性分析结果见图 6。成虫的 Shannon-Wiener 指数为 4.11 显著大于幼虫的 3.07 ($P=0.040$), 成虫的 Simpson 指数为

0.83 极显著大于幼虫的 3.07 ($P=0.005$) (图 6: A, B), 表明成虫比幼虫体内真菌群落多样性更高, 物种分布更均匀。成虫的 ACE 指数为 576.65 大于幼虫的 289.92 但差异不显著 ($P=0.061$),

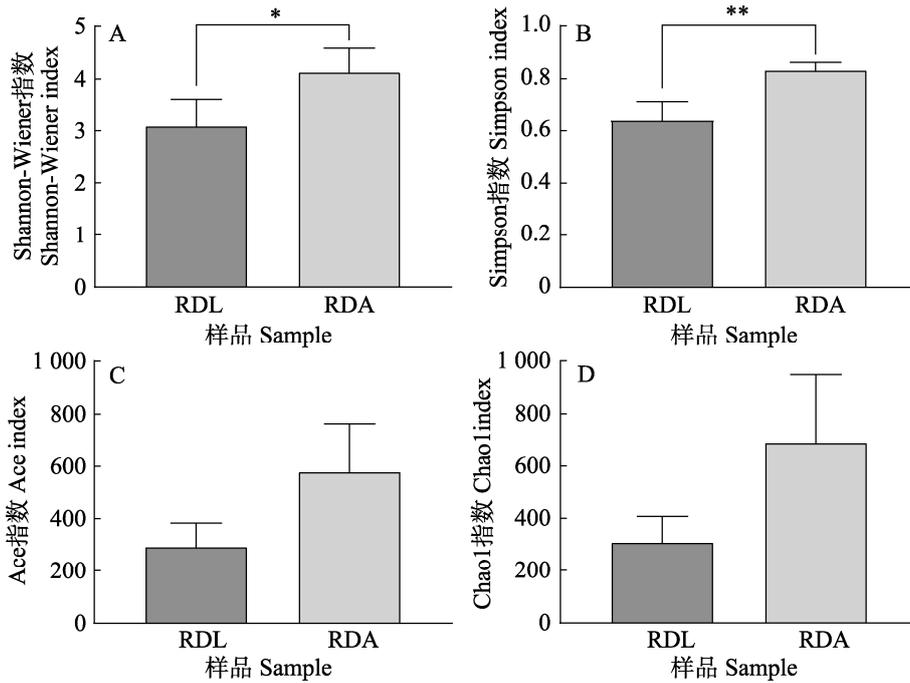


图 6 谷蠹幼虫和成虫体内真菌 α 多样性指数差异分析

Fig. 6 Variance analysis of the α -diversity index of fungus in larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

A. Shannon-Wiener 指数; B. Simpson 指数; C. ACE 指数; D. Chao1 指数。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。
A. Shannon-Wiener index; B. Simpson index; C. ACE index; D. Chao1 index. * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

成虫的 Chao1 指数为 688.89 大于幼虫的 306.15 但差异不显著 ($P=0.064$) (图 6: C, D), 表明成虫比幼虫体内真菌物种丰富度高但差异不显著。

Beta 多样性分析结果表明, 谷蠹幼虫各样本聚集在一起, 成虫各样本聚集在一起, 显示出幼虫和成虫 2 个水平 (图 7)。进一步对组间距离进行多元方差分析, 结果显示幼虫和成虫两组间真菌群落结构存在显著差异 ($R^2=0.245$, $P=0.030$)。

3 讨论

本研究基于二代高通量测序技术, 对谷蠹成虫和幼虫体内细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 序列进行测序分析, 探究谷蠹体内微生物群落组成多样性。结果表明, 谷蠹所有样本细菌共聚类到 291 个 OTUs, 注释到 24 门, 50 纲, 95 目, 141 科, 213 属; 真菌共聚类到 963 个 OTUs, 注释到 11 门, 35 纲, 68 目, 125 科, 195 属。在数据库进行物种注释时, 由于数据库 ITS1 序列信息不足,

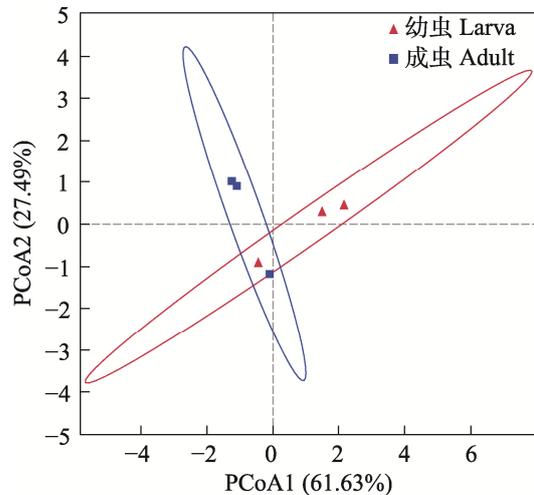


图 7 谷蠹幼虫和成虫体内真菌主坐标分析

Fig. 7 PCoA analysis of fungus in larvae and adults of *Rhyzopertha dominica*

很多真菌序列没有注释到纲和门水平。从聚类结果看, 真菌的丰富度是细菌的 2.4 倍, 可以明确谷蠹体内真菌资源丰富, 有待开发研究。

本研究发现谷蠹体内优势共生菌是 FERD, 属于拟杆菌门, 拟杆菌纲, 黄杆菌目。FERD 16S rDNA 序列对比发现它与锯谷盗 *Oryzaephilus*

surinamensis 的胞内共生菌 *Candidatus Shikimatogenerans silvanidophilus* 在分类地位上最为接近, 与其它昆虫内共生菌如半翅目昆虫的 *Sulcia* 和蟑螂体内的 *Blattabacterium* 共同组成拟杆菌门下一个新的分支 (Okude *et al.*, 2017; Kiefer *et al.*, 2021)。 *S. silvanidophilus* 在锯谷盗腹部形成 4 个椭圆形菌胞体, 在锯谷盗成虫体内感染密度比幼虫高, 抗生素消除 *S. silvanidophilus* 的锯谷盗成虫表皮厚度较薄, 对干旱环境的适应能力降低 (Engl *et al.*, 2018)。这与本研究 FERD 在谷蠹成虫体内相对丰度高于幼虫结果一致, 因此推测 FERD 在成虫体内相对丰度升高与成虫羽化后表皮形成有关。除 FERD 之外, 谷蠹体内优势菌门还有变形菌门和厚壁菌门, 这些也是其它鞘翅目昆虫如赤拟谷盗 *T. castaneum*、暗黑鳃金龟和云斑白条天牛 *Batocera lineolata* 的肠道优势菌 (Huang and Zhang, 2013; 王争艳等, 2020; 徐蕾等, 2022), 这些菌可能也处于谷蠹的肠道中, 可进一步分离培养, 研究其功能。谷蠹体内的真菌优势菌属链格孢属是常见的粮食真菌, 粮食作物在田间生长和收获期容易感染 (祁智慧等, 2022), 有可能是谷蠹取食小麦时摄入。此外, 谷蠹体内多种微生物的功能以及微生物与谷蠹的互作关系还有待进一步研究。

Beta 多样性分析显示谷蠹成虫和幼虫体内细菌和真菌群落差异显著, Alpha 多样性分析显示成虫体内细菌多样性比幼虫高, 而成虫 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数显著低于幼虫, 是因为成虫体内优势菌 FERD 占比过高, 细菌群落分布均匀度下降。昆虫体内微生物群落变化是对环境变化和宿主生理变化的反应, 是为了满足宿主的生态需求或生理需求, 群居社会性蜜蜂从低龄幼虫到高龄幼虫肠道微生物多样性升高, 因为高龄幼虫进食量比低龄幼虫多 (Kwong and Moran, 2016; 黄敦元, 2015)。白蜡虫 *Ericerus pela* 雌虫比雄虫体内细菌群落多样性更高, 因为雄虫发育过程中体表覆盖一层白蜡, 生活环境比雌虫简单 (吕品, 2019)。本研究中成虫体内真菌多样性比幼虫有显著升高, 原

因可能是谷蠹幼虫生活在粮粒内部, 进食单一, 活动范围小, 生长至成虫钻出粮粒, 接触到的外界环境更复杂, 取食更多样化。细菌功能预测结果显示, 幼虫和成虫体内细菌功能比较接近, 主要包括膜转运、复制与修复、氨基酸代谢和能量代谢。细菌功能预测是基于 16S rDNA 片段在数据库的注释结果, 其功能仍需进一步实验验证。

综上所述, 谷蠹体内具有丰富的真菌和细菌种类, 且幼虫和成虫微生物种类、多样性丰度存在差异, 这些微生物可能影响宿主生命活动、抗药性产生、能量代谢及细胞生理过程等, 是防治谷蠹的重要靶标, 也是挖掘微生物防治害虫的重要资源。本研究基于高通量测序技术全面分析了谷蠹微生物组成和多样性, 研究结果为下一步研究微生物功能和“抑菌治虫”策略提供参考, 同时为揭示共生菌与谷蠹环境适应性关系奠定基础。

参考文献 (References)

- Chao A, 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4): 265–270.
- Chao A, Hwang W, Kou C, 2000. Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica*, 10(1): 227–246.
- Bertino-Grimaldi D, Medeiros MN, Vieira RP, Cardoso AM, Turque AS, Silveira CB, Albano RM, Bressan-Nascimento S, Garcia ES, de Souza W, Martins OB, Machado EA, 2013. Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana* fed on different lignocellulosic materials. *SpringerPlus*, 2(1): 1–11.
- Consuegra J, Grenier T, Akherraz H, Rahioui I, Gervais H, da Silva P, Leulier F, 2020. Metabolic cooperation among commensal bacteria supports *Drosophila* juvenile growth under nutritional stress. *iScience*, 23(6): 101232.
- Engl T, Eberl N, Gorse C, Krüger T, Schmidt THP, Plarre R, Adler C, Kaltenpoth M, 2018. Ancient symbiosis confers desiccation resistance to stored grain pest beetles. *Molecular Ecology*, 27(8): 2095–2108.
- Huang DY, Gu P, Su TJ, Yu JF, He B, Niu ZQ, Zhu CD, 2015. The study on bionomics character of *Colletes gigas* (Hymenoptera, Colletidae). *Journal of Environmental Entomology*, 37(1): 133–138. [黄敦元, 谷平, 苏田娟, 余江帆, 何波, 牛泽清, 朱朝东, 2015. 大分舌蜂主要生物学特性研究. *环境昆虫学报*, 37(1): 133–138.]

- Huang S, Zhang H, 2013. The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, 8(2): e57169.
- Jia QZ, Wu W, Wang YQ, Alexander PB, Sun CD, Gong ZH, Cheng JN, Sun HB, Guan YF, Xia XF, Yang L, Yi X, Wan YY, Wang HD, He J, Futreal PA, Li QJ, Zhu B, 2018. Local mutational diversity drives intratumoral immune heterogeneity in non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, 9(1): 5361.
- Kiefer JST, Batsukh S, Bauer E, Hirota B, Weiss B, Wierz JC, Fukatsu T, Kaltenpoth M, Engl T, 2021. Inhibition of a nutritional endosymbiont by glyphosate abolishes mutualistic benefit on cuticle synthesis in *Oryzaephilus surinamensis*. *Communications Biology*, 4(1): 554.
- Kou RM, Li Y, Dou FY, Zhou ZY, Huang DY, 2021. Diversity and differences of gut bacterial communities in different instar larvae and diapause prepupae of *Colletes gigas* (Hymenoptera: Colletidae). *Acta Entomologica Sinica*, 64(6): 682–693. [寇若玫, 李月, 窦飞越, 周泽扬, 黄敦元, 2021. 大分舌蜂不同龄期幼虫及滞育预蛹肠道细菌群落多样性及其差异. 昆虫学报, 64(6): 682–693.]
- Kwong WK, Moran NA, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(6): 374–384.
- Li DD, Zhou Q, Yan XP, Wang DX, Wang ZM, Shao XL, 2021. Geographical distribution characteristics research of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) in different grain storage environments. *Journal of The Chinese Cereals and Oils Association*, 36(2): 121–125. [李丹丹, 周庆, 严晓平, 王殿轩, 汪中明, 邵小龙, 2021. 不同储粮环境下谷蠹的地理分布特征研究. 中国粮油学报, 36(2): 121–125.]
- Longstaff BC, 1999. An experimental and modelling study of the demographic performance of *Rhyzopertha dominica* (F.). I. development rate. *Journal of Stored Products Research*, 35(1): 89–98.
- Lv P, 2019. Diversity and dynamic changes of symbiotic bacteria in the development of *Ericerus pela*. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry. [吕品, 2019. 白蜡虫 *Ericerus pela* 发育过程中体内共生菌多样性及动态变化分析. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Miao SY, 2017. Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from 38 species of stored grain insects and the reproductive manipulation of *Tribolium confusum* caused by *Wolbachia*. Master dissertation. Zhengzhou: Henan University of Technology. [苗世远, 2017. 38种储粮昆虫中 *Wolbachia* 的共生情况调查及 *Wolbachia* 对杂拟谷盗生殖调控的研究. 硕士学位论文. 郑州: 河南工业大学.]
- Moran NA, Degan PH, 2006. Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Molecular Ecology*, 15(5): 1251–1261.
- Noda H, Koizumi Y, 2003. Sterol biosynthesis by symbiotes: Cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6): 649–658.
- Noda H, Omura T, 1992. Purification of yeast-like symbiotes of planthoppers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(1): 104–105.
- Okude G, Koga R, Hayashi T, Nishide Y, Meng XY, Nikoh N, Miyano A, Fukatsu T, 2017. Novel bacteriocyte-associated pleomorphic symbiont of the grain pest beetle *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Zoological Letters*, 3: 1–12.
- Opit GP, Phillips TW, Aikins MJ, Hasan MM, 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1107–1114.
- Perkin LC, Smith TPL, Oppert B, 2021. Variants in the mitochondrial genome sequence of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). *Insects*, 12(5): 387.
- Qi ZH, Zhang HY, Tian L, Tang F, 2022. Research progress in community composition and diversity of fungi from the grain. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*. 37(5): 24–31. [祁智慧, 张海洋, 田琳, 唐芳, 2022. 粮食真菌群落组成及多样性研究进展. 中国粮油学报, 37(5): 24–31.]
- Quan Y, Deng YX, Lv LS, Huang SC, 2010. Influence of moisture of maize flour on the development and reproduction of *Rhyzopertha dominica*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(3): 498–502. [权跃, 邓永学, 吕龙石, 黄世臣, 2010. 玉米面水分含量对谷蠹生长发育和繁殖的影响. 昆虫知识, 47(3): 498–502.]
- Rosenthal R, Cadieux EL, Salgado R, Bakir MA, Moore DA, Hiley CT, Lund T, Tanić M, Reading JL, Joshi K, Henry JY, Ghorani E, Wilson GA, Birkbak NJ, Jamal-Hanjani M, Veeriah S, Szallasi Z, Loi S, Hellmann MD, Feber A, Chain B, Herrero J, Quezada SA, Demeulemeester J, van Loo P, Beck S, McGranahan N, Swanton C, The TRACERx consortium, 2019. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature*, 567(7749): 479–485.
- Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A, Ürenden G, Lulay C, Schneider S, Goerdts S, Glimm H, Krammer PH, Schmidt M, von Kalle C, 2015. High-resolution

- analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nature Communications*, 6: 8081.
- Scully ED, Geib SM, Carlson JE, Tien M, McKenna D, Hoover K, 2014. Functional genomics and microbiome profiling of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) reveal insights into the digestive physiology and nutritional ecology of wood feeding beetles. *BMC Genomics*, 15: 1096.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W, 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annual Review Genetics*, 42: 683–707.
- Venturi V, Kedzierska K, Turner SJ, Doherty PC, Davenport MP, 2007. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *Journal of Immunological Methods*, 321(1/2):182–195.
- Vigneron A, Masson F, Vallier A, Balmand S, Rey M, Vincent-Monégat C, Aksoy E, Aubailly-Giraud E, Zaidman-Rémy A, Heddi A, 2014. Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current Biology*, 24(19): 2267–2273.
- Wang GC, Fu Q, Zhang ZT, 2005. Yeast like symbiotes and their nutritional function in rice planthoppers. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(4): 353–357. [王国超, 傅强, 张志涛, 2005. 稻飞虱体内的类酵母共生菌及其营养功能. 昆虫知识, 42(4): 353–357.]
- Wang ZY, Wang Y, He MT, Lu YJ, 2020. Diversity of intestinal bacteria in different geographic populations *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 617–622. [王争艳, 王洋, 何梦婷, 鲁玉杰, 2020. 不同地理种群赤拟谷盗肠道细菌群落多样性分析. 应用昆虫学报, 57(3): 617–622.]
- Xu L, Chen NM, Yang ZD, Zhou H, Li Q, Wei SF, 2022. Effects of host switching on diversity of intestinal bacteria in *Bactocera lineolata* larvae. *Guangdong Agricultural Sciences*, 49(4): 64–73. [徐蕾, 陈乃明, 杨振德, 周浩, 李琼, 韦善方, 2022. 寄主转换对云斑白条天牛幼虫肠道细菌多样性的影响. 广东农业科学, 49(4): 64–73.]
- Zhou GL, Cao Y, Wang QQ, Li N, Liu L, Bai CQ, Zhang T, 2018. Effect of temperature on flight behavior of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) adults. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 39(6): 105–110. [周国磊, 曹阳, 王欠欠, 李娜, 刘璐, 白春启, 张涛, 2018. 温度对谷蠹成虫飞行行为的影响. 河南工业大学学报(自然科学版), 39(6): 105–110.]
- Zhu XY, You SJ, Liu TS, Zhang L, You MS, 2020. Research progress on *Wolbachia* endosymbionts in arthropods. *Acta Entomologica Sinica*, 63(7): 889–901. [朱翔宇, 尤士骏, 刘天生, 张玲, 尤民生, 2020. 节肢动物内共生菌 *Wolbachia* 的研究进展. 昆虫学报, 63(7): 889–901.]
- Zug R, Hammerstein P, 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS ONE*, 7(6): e38544.