

饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫肠道细菌多样性

田小燕^{1,2}, 宋福平², 张杰², 刘荣梅³, 张兴鹏³, 段江燕^{1,*}, 束长龙^{2,*}

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】分析比较饲喂玉米 *Zea mays* L. 秸秆的白星花金龟 *Protaetia brevitarsis* 幼虫中肠、后肠中细菌群落结构, 挖掘肠道细菌在白星花金龟消化秸秆中的功能。【方法】分别提取健康白星花金龟 3 龄幼虫 10 个样品(5 个中肠内含物、5 个后肠内含物)肠道细菌总 DNA, 利用 Illumina HiSeq 技术对白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌的 16S rDNA V4 区序列进行测序, 统计样品操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 数量, 分析物种丰度、 α 多样性和 β 多样性, 并将细菌群落信息映射到 KEGG 基因组数据库, 进行细菌群落功能挖掘。【结果】共获得白星花金龟 3 龄幼虫肠道细菌 1 062 897 高质量 reads, 聚类为 2 441 个 OTUs, 总共注释到 27 个门, 51 个纲, 77 目, 168 科, 326 属。在属的分类阶元上, 中肠中以假单胞菌属 *Pseudomonas* 为最优势属, 后肠中以脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* 为最优势属。 α 多样性分析表明, 后肠群落多样性更丰富; β 多样性分析结果显示, 后肠微生物群落更稳定。细菌群落功能分析结果显示, 中肠、后肠细菌群落都含有降解秸秆相关的酶系, 其中, 中肠降解木质素相关的通路更丰富, 后肠降解纤维素的酶更多。【结论】采用 Illumina HiSeq 测序技术明确了饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫中肠、后肠细菌群落结构与特点, 进一步发现了肠道细菌在白星花金龟秸秆消化过程中发挥的作用, 相关研究结果将为白星花金龟消化秸秆的机制深入研究提供参考, 为我国秸秆资源化利用提供新思路。

关键词: 白星花金龟; 肠道细菌; 16S rDNA; V4 区; 细菌群落; 群落多样性; 功能分析

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)06-0632-10

Diversity of gut bacteria in larval *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae) fed on corn stalk

TIAN Xiao-Yan^{1,2}, SONG Fu-Ping², ZHANG Jie², LIU Rong-Mei³, ZHANG Xing-Peng³, DUAN Jiang-Yan^{1,*}, SHU Chang-Long^{2,*} (1. School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China; 2. State Key Laboratory of Biology for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: 【Aim】To analyze and compare the structure of the bacterial communities in the midgut and hindgut of *Protaetia brevitarsis* larvae fed on *Zea mays* stalk, and to further explore the function of these gut bacteria in stalk digestion of this insect. 【Methods】The total DNA was extracted from 10 samples of healthy gut bacteria (5 midgut contents and 5 hindgut contents) of the 3rd instar larvae of *P. brevitarsis*. The V4 region of 16S rDNA of the bacterial communities in the midgut and hindgut of *P. brevitarsis* was sequenced by Illumina HiSeq techniques, and the number of operational taxonomic units (OTUs), species composition abundance, alpha diversity and beta diversity were analyzed. The gut bacteria community data were mapped to KEGG genome database for further bacterial community function discovery. 【Results】Totally, 1 062 897 high quality reads of gut bacteria of the 3rd instar larvae of *P.*

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201200)

作者简介: 田小燕, 女, 1990 年 6 月生, 山西宁武县人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: 15810307526@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: duanjiangyan123@163.com; clshu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-03-21; 接受日期 Accepted: 2017-05-02

brevitarsis were produced and clustered to 2 441 OTUs, which were annotated into 27 phylums, 51 classes, 77 orders, 168 families and 326 genera. At the genus level, *Pseudomonas* and *Desulfovibrio* were the most dominant genus in the midgut and hindgut, respectively. Alpha diversity data showed that the bacterial communities in the hindgut were more abundant than those in the midgut, and the beta diversity analysis indicated that the bacterial communities in the hindgut were more stable than those in the midgut. Function analysis of bacterial communities showed that both the bacterial communities in the midgut and hindgut contained stalk degradation enzymes, and the lignin degradation pathways were more abundant in the midgut while the cellulose degradation enzymes more abundant in hindgut. 【Conclusion】 The structure and characteristics of the bacterial communities in the midgut and hindgut of *P. brevitarsis* larvae fed on corn stalk were clarified, and their functions in helping *P. brevitarsis* digest stalk were discovered. These results will provide references for the further study on stalk digestion mechanism of this insect, and offer a new idea for utilization of crop straw resources in China.

Key words: *Protaetia bevitasis*; gut bacteria; 16S rDNA; V4 region; bacterial community; community diversity; function analysis

作物秸秆是农作物生产系统中一项重要的生物资源,如何合理化利用这一资源是目前引起人们关注的重要问题。据统计,随着粮食产量增加,我国秸秆年产量已经超过8亿t,可转化利用秸秆在5亿t左右(Jiang *et al.*, 2012; Chen, 2016)。目前,秸秆不合理的处理方式,不仅浪费资源,而且带来了严重的大气污染与水体污染。近年来,围绕秸秆的合理高效利用,国内外学者不断进行新的探索。

土栖昆虫等无脊椎动物在转化有机质(包括植物残体)中起着重要作用(Wolters, 2000)。白星花金龟 *Protaetia brevitarsis* Lewis 是鞘翅目(Coleoptera)金龟甲科(Scarabaeidae)昆虫,其幼虫腐食性,可取食植物秸秆、腐烂落叶、发酵木屑、菌糠、牛粪等,不为害植物,并且其消化上述废弃物产生的粪便对植物生长有较好的促进作用,在秸秆资源化利用方面有巨大的前景。目前,国内外已经有不少利用白星花金龟转化秸秆等废弃物的研究报道,结果显示,白星花金龟幼虫具有较好的秸秆转化效率,除了其粪便可以作为肥料之外,其虫体还含有大量优质的蛋白、脂肪以及对部分疾病有效的活性分子(Yeo *et al.*, 2013; 杨诚, 2014; Lee *et al.*, 2016)。上述研究结果显示,与堆肥等其他秸秆利用技术相比,利用白星花金龟处理秸秆可以产生更多有价值的产品,然而白星花金龟消化秸秆的机制尚不清楚。

昆虫的中肠、后肠是主要消化器官,之前研究显示,肠道微生物对其昆虫的食物消化等生命活动有重要的作用,包括提供必要的营养(Breznak, 2002; Ben-Yosef *et al.*, 2010),提供消化酶(Warnecke, 2007; Todaka, 2007; Watanabe and Tokuda, 2010),增强昆虫的防御能力(Oliver *et al.*, 2005)以及加快

昆虫解毒能力(Babendreier *et al.*, 2007)等。白星花金龟肠道微生物相关研究较少,杨诚(2014)在白星花金龟中分离了7株肠道微生物,其中5株分别为坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus*、环状芽孢杆菌 *Bacillus circlans*、侧孢芽孢杆菌 *Bacillus laterosporus*、浸麻芽孢杆菌 *Bacillus macerans* 和巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*,另外2株较新的细菌分别属于韦荣氏球菌属 *Veillonella* 和明串球菌属 *Leuconostoc*。而这些研究数据对全面了解白星花金龟肠道微生物群落结构及其在秸秆中的消化所用尚显不足。随着测序技术、分子生物信息技术的迅速发展,微生物基因组的迅速积累,近年来高通量测序技术在微生物群落与功能研究方面的应用日益得到人们重视(Asshauer *et al.*, 2015)。本研究利用 Illumina HiSeq 测序技术对饲喂玉米 *Zea mays* L. 秸秆的白星花金龟 *Protaetia brevitarsis* 3龄幼虫中肠、后肠微生物群落进行了分析;进一步利用微生物群落注释信息映射已发表的基因组数据,对秸秆主要成分(纤维素、木质素)降解相关的酶或代谢通路进行了统计分析,以期为进一步研究白星花金龟消化秸秆的机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

白星花金龟幼虫在室温 $28 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 $60\% \pm 10\%$ 和光周期 16L:8D 条件下饲养,以风干的玉米 *Z. mays* L. 秸秆加水湿润作为饲料,在恒温培养箱中培养,选取饲养获得的3龄幼虫作为供试昆虫。

1.2 白星花金龟中、后肠分离和肠道细菌总 DNA 提取

取虫体大小一致、健康的白星花金龟 3 龄幼虫 5 头,先用无菌水漂洗 30 s,再用 75% 酒精进行虫体表消毒,最后用无菌水清洗掉体表残留酒精,无菌操作条件下两侧剪开幼虫体表,仔细取出完整肠道后,分别将中肠、后肠剪下,取出肠道内含物,使用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) 对 10 个样品(5 个中肠内含物、5 个后肠内含物)分别提取肠道细菌总 DNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。DNA 样品于 -20℃ 保存,备用。

1.3 肠道细菌 16S rDNA 扩增和 PCR 产物纯化

以 1.2 节提取的肠道细菌总 DNA 为模板,采用细菌 V4 高变区通用引物对 16S rDNA 进行 PCR。所用引物为 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-NNNNNNGGACTACVSGGTATCTAAT-3') (NNNNN 是用于区分样品的 barcode) (Bokulich *et al.*, 2012), PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Taq mix 25 μ L, 浓度为 10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L, DNA 模板 100 ng, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 复性 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。扩增产物 140 V, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 仪采用日本 TaKaRa 公司 TP600; PCR 产物采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen AP-GX-250) 纯化, 切胶回收的 PCR 目的片段用 10 mmol/L Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。

1.4 肠道细菌文库构建及测序

将 1.3 节 PCR 产物进行荧光定量后,按照每个样品的测序量要求进行相应比例的混合。文库构建采用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation 试剂盒,具体步骤包括:(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 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 Illumina HiSeq 2500 (2 \times 250 bp) 进行上机测序。

1.5 数据优化和 OTU 聚类

HiSeq 测序得到的是双端序列数据,使用 PANDASEQ 软件进行数据过滤:(1)过滤 read 尾部质量值 15 以下的碱基,设置 4 bp 的窗口,如果窗口内的平均质量值低于 15,从窗口开始截去后端碱基;(2)根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对

reads 拼接 (merge) 成一条序列;(3)根据序列的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,barcode 允许的错配数为 0,最大引物错配数为 2,统计各样品的优质序列。

每个样品中随机选取 50 000 个优质序列进行 OTU 构建,使用 USEARCH (版本 8.0.1517) 流程 (Edgar, 2013) 对高质量的 16S rDNA 序列进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 聚类:(1)去除重复序列;(2)去掉 size = 1 的序列(去除没有重复的序列);(3)97% 的相似度进行聚类;(4)使用 UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) 的“Gold” database 去除嵌合体序列,生成 OTU 代表序列;(5)将每个样品的所有序列映射到 OTU 代表序列,生成 OTU 表及其相对丰度表,统计各样品可用的 reads 数目、OTU 数目,代表序列分别使用 RDP (版本 2.2) (Wang, 2007) 和 Greengenes (版本 13.8) (DeSantis *et al.*, 2006) 数据库注释和分类,可信度设置为 0.5,最后在界、门、纲、目、科、属分类水平上统计各测试样品中的群落组成。

1.6 肠道细菌群落多样性分析

在门和属分类水平上用 Excel 软件的条形图统计并比较中肠和后肠内的优势群落结构和组成的差异。用 α 多样性 (alpha diversity) 分析单个样品内部的细菌物种多样性,使用 Mothur (版本 1.36.1) (Schloss *et al.*, 2009) 计算每个样品的菌群丰度 (community richness) 指数 (Chao 和 Ace) 和菌群多样性 (community diversity) 指数 (Shannon 和 Simpson),并作出相应的稀释曲线图用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。用 β 多样性 (beta diversity) 分析样品之间在物种多样性的差异,本文使用 R 软件 (Version 2.15.3) 基于 Unweighted Uni Frac、Weighted UniFrac 距离进行 PCoA 分析,利用 KO 丰度表进行 PCA 分析,并选取贡献率最大的主坐标组合进行作图展示,图中样品的距离越接近,表示样品的物种组成结构越相似 (Lozupone and Knight, 2005; Park *et al.*, 2014)。

1.7 肠道细菌群落功能分析

在完成 OTU 序列物种注释的基础上,直接或者间接映射到与之相关的 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 已注释的微生物基因组,结合注释到的细菌在样品中的丰度信息、基因组中 16S rRNA 基因拷贝数以及功能基因 (使用 KEGG Ortholog, KO 表征),进一步获得样品的包含的部分已知细菌的功能基因数据及其丰度,对样品中的代

谢途径及秸秆代谢参与的酶进行分析 (Asshauer *et al.*, 2015)。

2 结果

2.1 白星花金龟肠道细菌 16S rDNA 序列拼接与组装

从白星花金龟 3 龄幼虫的中肠和后肠样品中共获得 1 062 897 条高质量的细菌 16S rDNA 序列, 每个样品随机选取的 50 000 个序列通过质量控制后可用的序列按 97% 的相似度进行 OTU 聚类 (表 1), 基于 OTUs 的注释结果显示, 10 个样品合并的总体样品共获得 2 441 个 OTUs, 总共注释到 27 个门, 51 个纲, 77 目, 168 科, 326 属。

2.2 白星花金龟幼虫中、后肠微生物种类及其丰度比较

图 1(A) 显示, 中肠和后肠中物种丰度排名前 9 的门分类单元为厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、广古菌门 (Euryarchaeota)、迷踪菌门 (Elusimicrobia) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 为优势类群, 但是比例有所不同。中肠中厚壁菌门占 27.89% ± 9.89%, 变形菌门占 31.02% ± 4.77%, 放线菌门占 23.91% ± 8.31%, 拟杆菌门占 4.49% ± 0.83%, 浮霉菌门占 4.50% ±

3.03%, 疣微菌门占 3.03% ± 2.54%, 广古菌门占 0.25% ± 0.16%, 迷踪菌门占 0.07% ± 0.02%, 酸杆菌门占 0.60% ± 0.35%, 其他为 4.23% ± 0.92%; 后肠中厚壁菌门占 39.37% ± 3.18%, 变形菌门占 19.52% ± 2.99%, 放线菌门占 7.78% ± 2.09%, 拟杆菌门占 2.25% ± 2.86%, 浮霉菌门占 0.65% ± 0.19%, 疣微菌门占 0.54% ± 0.12%, 广古菌门占 1.51% ± 0.67%, 迷踪菌门占 0.79% ± 0.45%, 酸杆菌门占 0.28% ± 0.08%, 其他为 7.08% ± 2.12%。

从丰度排名前 10 属水平 (图 1: B) 上比较中肠和后肠中各属所占比例, 分别为芽孢杆菌属 *Bacillus* (12.78% ± 5.56% vs 4.17% ± 1.98%)、假单胞菌属 *Pseudomonas* (14.69% ± 7.19% vs 2.31% ± 0.29%)、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (0.77% ± 0.14% vs 9.77% ± 3.51%)、*Turicibacter* (2.01% ± 3.43% vs 0.21% ± 0.08%)、产乙酸钠嗜蛋白质属 *Proteiniphilum* (0.21% ± 0.02% vs 4.92% ± 0.97%)、*Alistipes* (0.25% ± 0.05% vs 3.89% ± 0.82%)、拟杆菌属 *Bacteroides* (0.14% ± 0.06% vs 2.43% ± 1.27%)、藤黄单胞菌属 *Luteimonas* (1.56% ± 1.45% vs 0.31% ± 0.04%)、*Terrimicrobium* (1.06% ± 0.37% vs 0.14% ± 0.06%)、*Planctomicrobium* (1.07% ± 0.45% vs 0.11% ± 0.02%) 和其他 (65.47% ± 4.90% vs 71.78% ± 1.23%), 综上可知, 总体来说中肠和后肠在门、属水平上优势菌物种类别一致, 但丰度大小比例不同。

表 1 白星花金龟 3 龄幼虫肠道细菌 16S rDNA 序列分析

Table 1 Sequence analysis of 16S rDNA of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Protaetia brevitarsis*

样品 Samples	有效序列数目* Number of valid sequences*	OTU 数目 Number of OTUs	不同分类阶元归类数目 Number of different taxonomic categories				
			门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
H01	36 833	1 623	24	43	65	139	235
H02	41 526	1 639	25	43	63	138	231
H03	38 483	1 603	24	44	63	136	239
H04	32 950	1 621	25	46	67	137	236
H05	32 083	1 623	25	45	68	142	239
M01	34 717	1 517	24	42	69	148	263
M02	38 584	1 481	26	45	68	148	256
M03	35 496	1 454	25	45	69	148	256
M04	37 632	1 548	23	43	65	143	265
M05	37 242	1 615	24	45	64	142	259
总数 Total	365 546	2 441	27	51	77	168	326

H01 - H05: 后肠样品 Hindgut samples; M01 - M05: 中肠样品 Midgut samples. 下同 The same below. 星号表示每个样品随机抽取 50 000 个序列进行分析, 通过拼接、过滤得到的有效数据的数量。The asterisk indicates the number of the valid data after analysis, assembling and filtering of 50 000 sequences randomly selected from each sample.

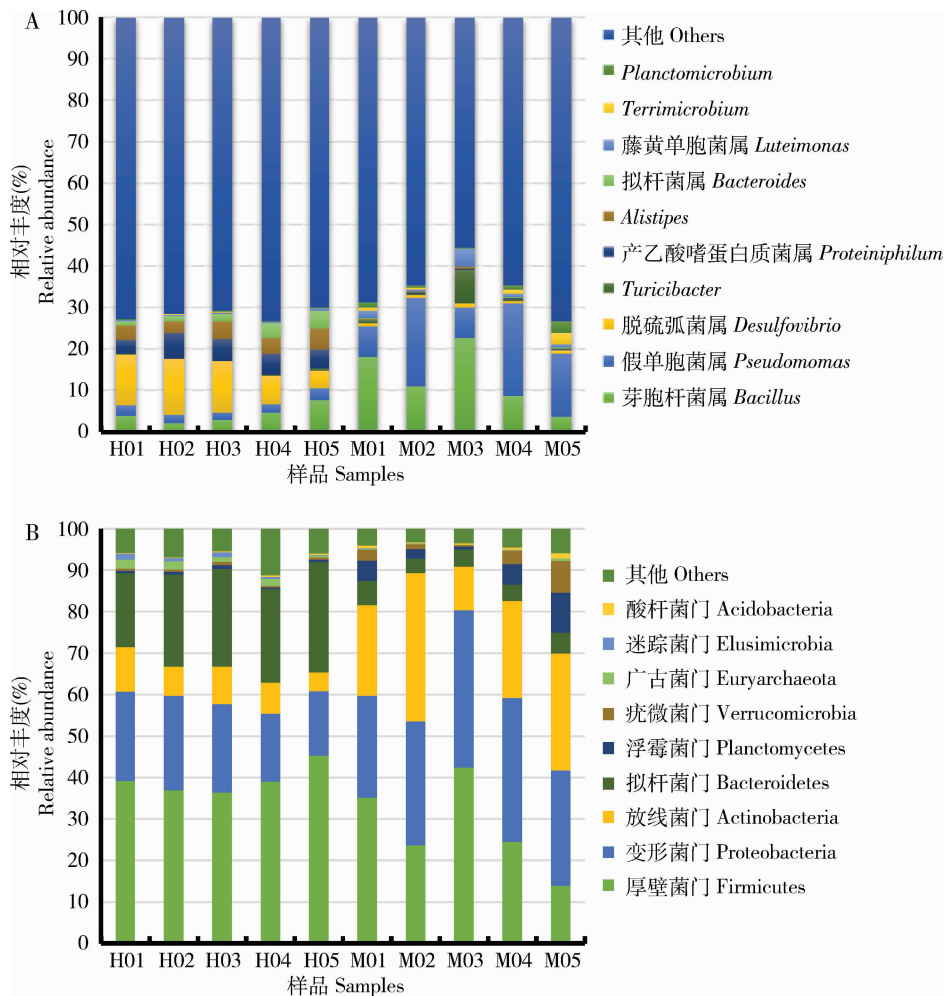


图1 白星花金龟3龄幼虫肠道细菌优势门(A)和属(B)相对丰度

Fig. 1 Relative abundance of dominant phylum (A) and genus (B) of gut bacteria in the 3rd instar larvae of *Protactia brevitarsis*

2.3 白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌 α 多样性分析

稀释曲线(rarefaction curve)可以用来评价测序量是否足以覆盖所有类群,并间接反映样品中物种的丰富程度。当曲线趋于平缓时,说明测序数据量合理,更多的数据量对发现新 OTU 的贡献很小,反之则表明继续测序还可能产生较多新的 OTU,本研究各样品的覆盖度都在 99% 以上且各样品的物种稀释曲线趋于饱和(图 2),表明各样品测序深度足够。比较白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌群落的 Shannon 指数、Chao 指数和 Simpson 指数发现,中肠和后肠微生物多样性都具有显著性差异;另外后肠细菌群落的 Shannon 平均指数和 Chao 平均指数均大于中肠,说明后肠微生物群落多样性、丰富度都高于中肠;后肠细菌群落的 Simpson 平均指数低于中肠,说明后肠优势微生物更集中(表 2)。

2.4 白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌 β 多样性分析

本研究通过 PCoA (principal co-ordinates analysis)可视化方法观察样品间的多样性差异,利用微生物群落多样性进行 PCoA 分析,发现样品的组织来源是样品间差异的主要原因。中肠 5 个样品和后肠 5 个样品分别聚集在不同的椭圆内,之间没有交集,表示中肠和后肠的细菌群落具有显著差异,后肠椭圆内的 5 个样品之间的距离都小于中肠,可见后肠样品间的微生物群落一致性更高。PC1 和 PC2 分别表示对样品差异贡献率最大的两个因素。 β 多样性分析(图 3)是用来研究样品之间在物种多样性差异。但是 unweighted PCoA 与 weighted PCoA 在 PC1 上有较大差异,unweighted PCoA 的 PC1 为 23.0%,而 weighted PCoA 的 PC1 为 79.0%,说明物种的丰度对这两组样品的差异贡献更大。酶是降解

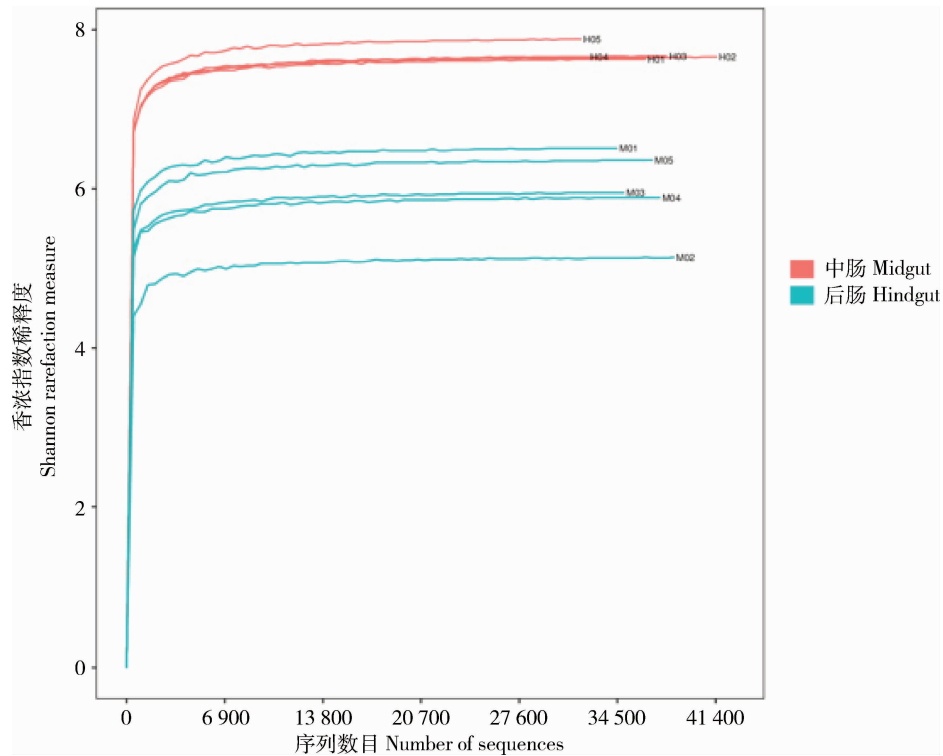


图2 白星花金龟3龄幼虫中肠和后肠中细菌群落香浓指数稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of Shannon index of bacterial communities in the midgut and hindgut of the 3rd instar larvae of *Prototia brevitaris*

表2 白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌多样性指数

Table 2 Alpha diversity indices of the bacteria in the midgut and hindgut of the 3rd instar larvae of *Prototia brevitaris*

样品 Sample	多样性指数 Diversity index		
	Chao1	Shannon2	Simpson
中肠 Midgut	1 524.98 ± 55.79	5.97 ± 0.48	0.09 ± 0.03
后肠 Hindgut	1 623.32 ± 11.22	7.7 ± 0.09	0.02 ± 0.002
<i>P</i>	0.009	0.000	0.001

图中数据为平均值 ± 标准差; $P < 0.01$ 表明组间存在极显著差异(单因素方差分析)。Data in the table are mean ± SD. $P < 0.01$ shows extremely significant differences between groups (one-way ANOVA).

秸秆的主要活性物质,进一步比较了各样品在酶种类映射水平上的差异,结果显示(图3)样品的组织来源是同样是样品间差异的主要原因,PC1为84.8%,说明中肠、后肠微生物群落差异进一步在消化功能上反映出来。

2.5 白星花金龟幼虫中肠和后肠细菌群落功能分析

通过16S rDNA序列注释信息映射KEGG基因组数据,可以获得已测序细菌基因组编码的酶以及代谢通路信息。秸秆中的主要成分包括纤维素、半纤维素以及木质素等。其中纤维素、半纤维素属于多糖,其降解主要依赖糖苷酶和部分单加氧酶等(Johansen, 2016),而木质素降解相对复杂,主要涉

及芳香类化合物的降解途径(Bugg *et al.*, 2011)

按照KEGG基因组映射数据,中肠和后肠含有的糖苷酶有6-磷酸- β -葡糖苷酶、葡聚糖1,4- α -葡糖苷酶、葡聚糖1,6- α -葡糖苷酶、 α -葡糖苷酶、寡聚-1,6-葡萄糖苷酶、 β -葡糖苷酶、葡聚糖1,3- β -葡糖苷酶、纤维素酶和葡聚糖内切-1,3- β -D-葡萄糖苷酶,各种酶基因的丰度情况见图4(A),中肠糖苷酶以 β -葡糖苷酶(0.24%)、 α -葡糖苷酶(0.11%)和纤维素酶(0.08%)3种占优势,后肠也以这3种糖苷酶(β -葡糖苷酶0.30%、 α -葡糖苷酶0.13%、纤维素酶0.09%)丰度最大,但后肠中这3种糖苷酶的丰度均大于中肠,二者存在显著差异($P < 0.05$)。该结果表明,后肠含有更高丰度的糖苷酶基因,纤维素降解

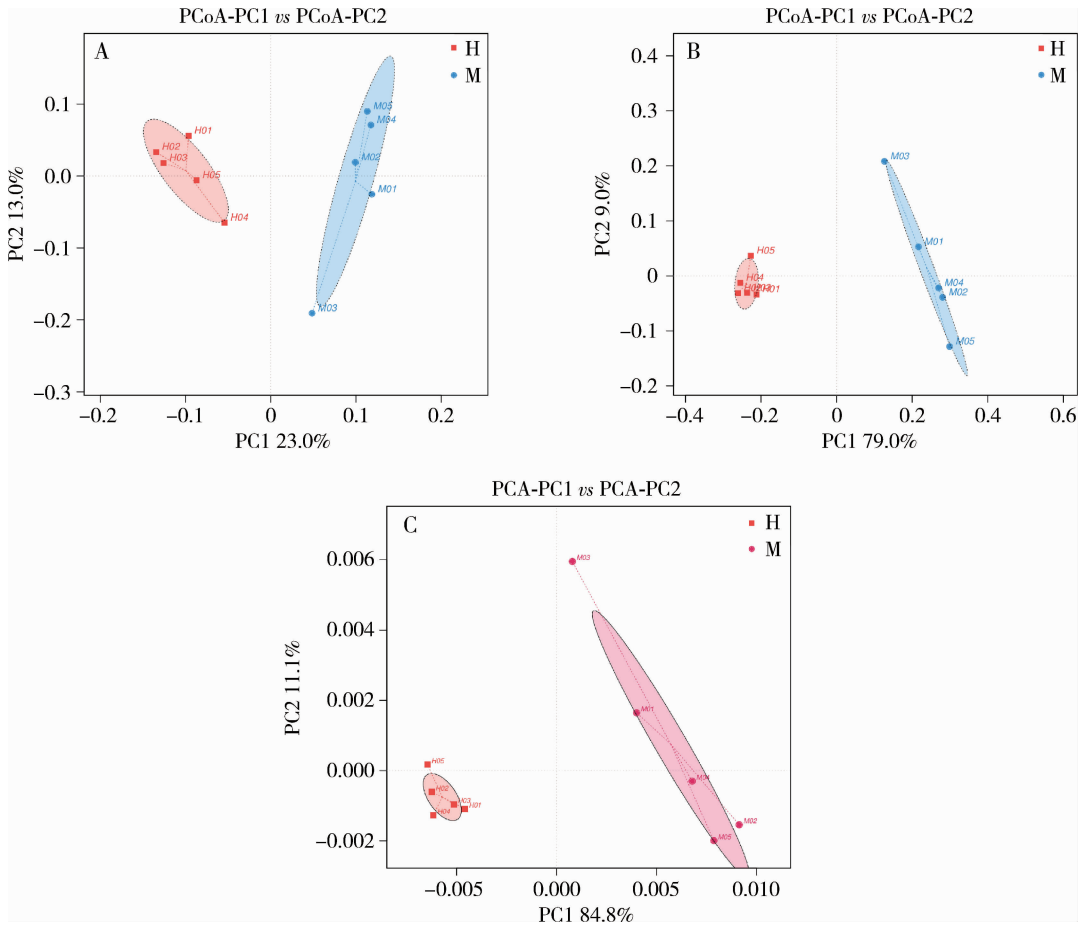


图3 白星花金龟3龄幼虫肠道微生物基于不同水平的主坐标分析

Fig. 3 PCoA analysis of gut microbiota in the 3rd instar larvae of *Protactia brevitaris* based on different levels

A, B: 分别是基于 Unweighted UniFrac 距离与 Weighted UniFrac 距离进行主坐标分析 PCoA analysis based on unweighted distance and weighted UniFrac distance, respectively; C: 基于酶种类水平的主成分分析 PCA analysis based on enzyme. PC1 和 PC2 代表影响肠道微生物群落多样性最大的 2 个因素, 百分比数值表示对样品差异的贡献值。PC1 and PC2 represent the two mainly factors that affect the diversity of the gut bacterial communities, and the percentage represents the contribution value of the difference in samples.

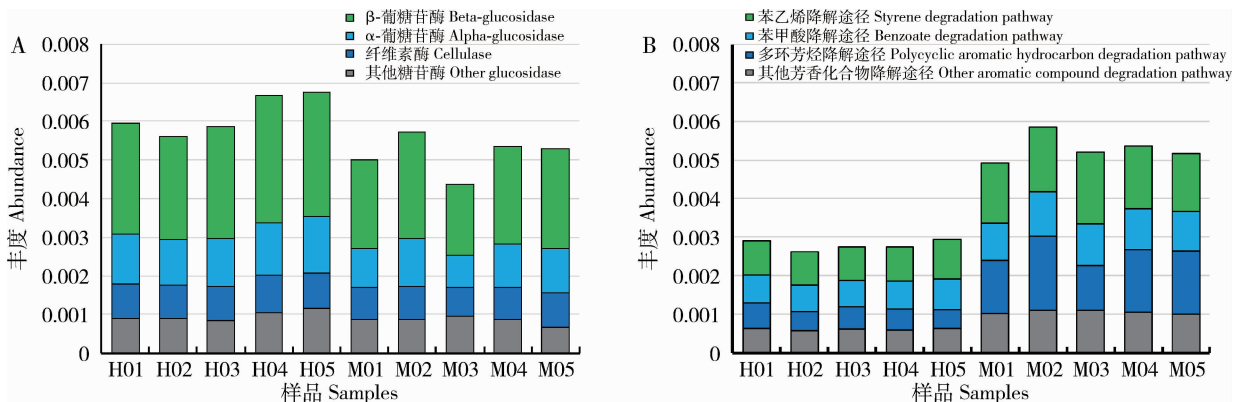


图4 白星花金龟3龄幼虫中肠和后肠细菌群落纤维素降解相关酶(A)和木质素降解相关通路(B)丰度

Fig. 4 Abundance of cellulose degradation related enzymes (A) and lignin degradation pathways

(B) of the bacterial communities in the midgut and hindgut of the 3rd instar larvae of *Protactia brevitaris*

可能更多地发生在后肠中。

进一步对芳香化合物降解涉及的通路丰度进行统计(图 4: B),发现主要有多环芳烃降解、苯甲酸降解、甲苯的降解、乙苯的降解、苯乙烯降解和萘降解这几种,且中肠和后肠中都以多环芳烃降解、苯甲酸降解和苯乙烯降解丰度最高,但中肠和后肠中各降解途径丰度大小不同(中肠中多环芳烃降解 0.15%,后肠中多环芳烃降解 0.06%;中肠中苯甲酸降解 0.11%,后肠中苯甲酸降解 0.07%;中肠中苯乙烯降解 0.16%,后肠中苯乙烯降解 0.09%),可见中肠中降解通路丰度明显高于后肠,二者存在极显著差异($P < 0.01$),该结果表明中肠可能更多地参与木质素的降解。

3 讨论

由于白星花金龟特殊的食性以及其在转化秸秆中的潜力,相继开展了针对其肠道微生物的研究,以期为进一步探索秸秆消化机制提供依据。王菲菲等(2009)采用传统的培养基分离细菌的方法在白星花金龟成虫中肠中只分离到 5 个细菌属,分别鉴定为气球菌属 *Aerococcus*、短状杆菌属 *Brachybacterium*、棍状杆菌属 *Clavibacter*、李斯特菌属 *Listeria* 及皮杆菌属 *Dermabacter*,其中皮杆菌属细菌数量占优势,而杨诚(2014)对 7 株白星花金龟幼虫肠道细菌分析结果显示,其中有 5 株属于芽孢杆菌属 *Bacillus*。本研究采用了 Illumina HiSeq 2500 对白星花金龟 3 龄幼虫中肠和后肠样品高通量测序分析二者的群落结构和组成,中肠和后肠样品合并共获得 2 441 个 OTUs,总共注释到 27 个门,51 个纲,77 目,168 科,326 属。与传统培养分析法相比,本研究利用高通量测序技术获得了更全面准确的微生物群落信息,对进一步秸秆降解机制分析提供了可靠的数据。

通过比较白星花金龟中肠、后肠的优势菌群,从优势门水平来说,中肠和后肠的优势菌群在组成上基本一致,但是其丰度具有一定的差异。中肠中以变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)为前 3 个优势门,而后肠中以厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)为前 3 个优势门。Egert 等(2003)对饲喂土壤有机质的花金龟科的 *Pachnoda ephippiata* 幼虫肠道微生物研究也有类似结果,*Pachnoda ephippiata* 中肠中以厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)微生物

为主,而后肠中以厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)微生物为主。在属水平上对中肠、后肠微生物群落比较发现,中肠和后肠不同的生物学重复中属的丰度存在一定的差异,但整体的丰度趋势是相同的,所以该实验结果对进一步研究具有一定的指导意义,其中,中肠细菌群落的优势属是假单胞菌属 *Pseudomonas*、芽孢杆菌属 *Bacillus* 和 *Turicibacter* 优势属,而后肠细菌群落的优势属是脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*、产乙酸嗜蛋白质属 *Proteiniphilum* 和芽孢杆菌属 *Bacillus*,两者在优势属的丰度上有较大差别。推测这种差别是由两者肠道环境与食物消化程度不同造成的。昆虫肠道主要包含 3 个部分——前肠、中肠和后肠:前肠的主要功能是食物摄入和对食物的最初步消化;中肠为高碱性环境,pH 值约为 9~12,其中含有大量的碱性蛋白酶能消化食物中的蛋白质;后肠为消化道最后一段,pH 值较中肠低,其中富含多种多样的微生物,是进一步消化食物,同时也进行食物残渣和代谢废物的排出,并从排泄物中吸收水分和无机盐类的场所(Lemke *et al.*, 2003)。与后肠相比,中肠内含物是仅经过初步消化的食物,来源于食物中的微生物可能仍然存在于中肠内含物中,因此,中肠实际测到的细菌群落数据受食物中细菌影响较大;而后肠内含物不仅是经过较长时间消化的内含物,其与中肠也有明显的隔离,所以后肠检测到的细菌群落数据受食物中细菌的影响较小。按照上述推论,后肠应该具有更稳定的微生物群落结构,本研究通过 β 多样性分析对此进行了检验,分析结果显示后肠比中肠样品间的差异小,进一步验证了后肠细菌群落结构比中肠稳定的推论,并且 Zhang 和 Jackson(2008)对 *Costelytra zealandica* 以及 Egert 等(2005)对 *Melolontha melolontha* 肠道细菌的研究数据也支持该结论。

目前关于秸秆降解途径的研究主要围绕真菌、细菌降解纤维素、半纤维素和木质素相关的酶及产物进行。纤维素与半纤维素降解机制相对简单,降解过程研究得比较清楚,主要起作用的是糖苷水解酶和部分单加氧酶(Johansen, 2016),水解获得的单糖会直接被利用。本研究分析结果显示,白星花金龟后肠细菌群落中的糖苷酶丰度较高,推测纤维素、半纤维素的水解主要发生在后肠内。木质素的降解比较复杂,因为其主要结构单元含有苯丙烷结构,涉及芳香化合物的降解途径,仍采用含苯类似物作为底物进行研究,目前研究得比较清楚的有芳基醚、联

二苯、二芳基丙烷、阿魏酸以及原儿茶酸降解途径。上述途径中涉及的酶种类较多,包括氧化氢酶、乙二醛氧化酶、酚氧化酶、葡萄糖氧化酶、芳醇氧化酶、新阿魏酰酯酶和对香豆酰酯酶等 (Bugg *et al.*, 2011; Brown and Chang 2014; Pollegioni *et al.*, 2015; Kameshwar and Qin, 2016)。白星花金龟肠道中含有多种芳香化合物降解代谢途径,从丰度上看,主要分布在中肠,说明木质素降解消化主要发生在中肠。

本研究在完成白星花金龟中肠和后肠细菌群落分析的基础上,进一步利用明确的肠道微生物物种信息映射到 KEGG 数据库的微生物基因组,并利用基因组编码的功能基因信息对肠道微生物降解秸秆的途径进行了预测,目前实验室正在进行白星花金龟肠道转录组、肠道微生物宏基因组测序,今后将进一步对关键酶基因进行克隆验证,提出白星花金龟转化秸秆的机制。

参考文献 (References)

- Asshauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P, 2015. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17): 2882–2884.
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F, 2007. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59(3): 600–610.
- Ben-Yosef M, Aharon Y, Jurkevitch E, Yuval B, 2010. Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 277(1687): 1545–1552.
- Breznak JA, 2002. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integr. Comp. Biol.*, 42(2): 313–318.
- Bokulich NA, Joseph CL, Allen G, Benson AK, Mills DA, 2012. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS ONE*, 7(5): e36357.
- Brown ME, Chang MC, 2014. Exploring bacterial lignin degradation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 19: 1–7.
- Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R, 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 28(12): 1883–1896.
- Chen X, 2016. Economic potential of biomass supply from crop residues in China. *Appl. Energ.*, 166: 141–149.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Andersen GL, 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7): 5069–5072.
- Edgar RC, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*, 10(10): 996–998.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Christopher Q, Rob K, 2011. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194–2200.
- Egert M, Stingl U, Bruun LD, Pommerenke B, Brune A, Friedrich MW, 2005. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8): 4556–4566.
- Egert M, Wagner B, Lemke T, Brune A, Friedrich MW, 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11): 6659–6668.
- Jiang D, Zhuang D, Fu J, Huang Y, Wen K, 2012. Bioenergy potential from crop residues in China: availability and distribution. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 16(3): 1377–1382.
- Johansen KS, 2016. Lytic polysaccharide monoxygenases: the microbial power tool for lignocellulose degradation. *Trends Plant Sci.*, 21(11): 926–936.
- Kameshwar AK, Qin W, 2016. Recent developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms. *Int. J. Biol. Sci.*, 12(2): 156–171.
- Lee J, Lee W, Kim M, Hwang JS, Na M, Bae JS, 2016. Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protetaia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *J. Cell. Mol. Med.*, 21(6): 1217–1227.
- Lemke T, Stingl U, Egert M, Friedrich MW, Brune A, 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11): 6650–6658.
- Lozupone C, Knight R, 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8228–8235.
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS, 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(36): 12795–12800.
- Park H, Shin JW, Park SG, Kim W, 2014. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE*, 9(10): e109710.
- Pollegioni L, Tonin F, Rosini E, 2015. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.*, 282(7): 1190–1213.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister, EB Sahl, JW, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23): 7537–7541.
- Todaka N, Moriya S, Saita K, Hondo T, Kiuchi I, Takasu H, Kudo T, 2007. Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59(3): 592–599.
- Wang FF, Liu YS, Ji XX, Zheng JF, 2009. The isolation and identification of intestinal microflora of adult *Potosia brevitarsi*.

- Chin. J. Microecol.*, 21(9): 798–800. [王菲菲, 刘玉升, 姬小雪, 郑继法, 2009. 白星花金龟成虫肠道细菌的分离鉴定. 中国微生态学杂志, 21(9): 798–800]
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(16): 5261–5267.
- Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Sorek R, 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450(7169): 560–565.
- Watanabe H, Tokuda G, 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 55(1): 609–632.
- Wolters V, 2000. Invertebrate control of soil organic matter stability. *Biol. Fertil. Soils*, 31(1): 1–19.
- Yang C, 2014. Studies on the Biology of *Protaetia brevitarsis* (Lewis) and Its Feeding Habits on Maize Straw. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [杨诚, 2014. 白星花金龟生物学及其对玉米秸秆取食习性的研究. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文]
- Yeo H, Youn K, Kim M, Yun EY, Hwang JS, Jeong WS, Jun M, 2013. Fatty acid composition and volatile constituents of *protaetia brevitarsis* larvae. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 18(2): 150–156.
- Zhang H, Jackson TA, 2008. Autochthonous bacterial flora indicated by PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments from the alimentary tract of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Appl. Microbiol.*, 105(5): 1277–1285.

(责任编辑: 马丽萍)