凹唇壁蜂雌成虫滞育期、休眠期和破茧期肠道菌群 多样性分析

王光召¹ 马艺翔^{1,2} 秦敬泽³ 游银伟² 马朋涛¹ 李丽莉² 门兴元² 宋莹莹² 张 凯³ 李 霞² 王桂萍^{2*} 于 毅^{2*}

(1.烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005; 2.山东省农业科学院植物保护研究所,济南 250100;3.山东农业工程学院林业工程学院,德州 251100)

摘要:为明确凹唇壁蜂Osmia excavata 雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群的多样性及差异,解析其在 宿主健康与调控宿主生长发育中的作用,采用Illumina NovaSeq二代高通量测序技术对不同时期肠 道细菌16S rRNA V3~V4区域进行测序,分析雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群的多样性变化。结果 显示,凹唇壁蜂雌成虫在滞育期至破茧期肠道细菌菌群中共检测到41门96纲198目325科637属, 其中核心菌门是变形菌门,相对丰度介于75.98%~91.41%之间;核心菌属是Sodalis,相对丰度介于 59.65%~74.66%之间。Alpha多样性分析显示,从滞育期到休眠期,雌成虫肠道内菌群多样性指数 明显升高,从休眠期至破茧期,其肠道菌群多样性指数出现降低趋势;休眠期其肠道菌群的物种丰 富度和均匀度均最高,滞育期其肠道菌群的物种丰富度和均匀度均最低;Beta多样性分析结果显示, 从滞育期至破茧期,其肠道菌群结构相对稳定;LEfSe分析结果显示,从滞育期至破茧期其肠道菌 群在门、纲、目、科、属水平均存在显著差异,且差异显著菌群主要出现在休眠期。预测的不同时期的 肠道菌群功能不同,这与其成虫解除滞育进入休眠再破茧的生理过程密切相关。表明凹唇壁蜂雌成 虫从滞育期至破茧期肠道核心细菌种类一致,群落结构相对稳定,但是群落多样性发生明显变化。 关键词:凹唇壁蜂;滞育;休眠;破茧;肠道菌群;多样性

Analysis of intestinal microbiota diversity in female adult diapause, post-diapause and cocoon-breaking stages of mason bee *Osmia excavata*

Wang Guangzhao¹ Ma Yixiang^{1,2} Qin Jingze³ You Yinwei² Ma Pengtao¹ Li Lili² Men Xingyuan² Song Yingying² Zhang Kai³ Li Xia² Wang Guiping^{2*} Yu Yi^{2*}

(1. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong Province, China; 2. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong Province, China; 3. School of Forestry Engineering, Shandong Agriculture and Engineering University, Dezhou 251100, Shandong Province, China)

Abstract: To clarify the diversity and differences in the intestinal flora of mason bee *Osmia excavata* adult females from the diapause phase to the cocoon-breaking stage, and to analyze their role in host health and regulation of host growth and development, the Illumina NovaSeq second-generation high-throughput sequencing method was used to sequence the 16S rRNA V3 to V4 regions of gut bacteria and analyze changes in gut flora diversity from diapause to cocoon-breaking stages. The results revealed a total of 41 phyla, 96 classes, 198 orders, 325 families, and 637 genera in the intestinal bacterial flora of *O. excavata* female adults during these stages. The core phylum in the intestinal bacterial flora

基金项目:国家中药材产业技术体系建设专项(CARS-21)

^{*} 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wangguiping1018@126.com, robertyuyi@163.com 收稿日期: 2023-07-03

of *O. excavata* adult females during the diapause phase to cocoon-breaking stage was Proteobacteria, with relative abundance ranging from 75.98% to 91.41%; the core genus was *Sodalis*, with relative abundance ranging from 59.65% to 74.66%. Alpha diversity analyses showed that the diversity index of the intestinal flora increased significantly from the diapause phase to the post-diapause phase, followed by a decreasing trend from the diapause phase to the post-diapause phase. The species richness and homogeneity of gut flora were highest during the post-diapause period and lowest during the diapause period. Beta diversity analysis showed that the structure of the gut flora remained relatively stable from the diapause phase. LEfSe analysis revealed significant differences in intestinal flora at the level of phylum, class, order, family, and genus from the diapause phase to the cocoon-breaking phase, with the most significant differences appearing during the post-diapause period. The predicted functions of the gut flora at different times are closely related to the physiological process from diapause to post-diapause and cocoon-breaking in adults. This study indicated that *O. excavata* female adults maintained the same species of core gut bacteria from the diapause phase to the cocoon-breaking phase. While the community structure was relatively stable, the diversity of the community changed significantly.

Key words: Osmia excavata; diapause; post-diapause; cocoon-breaking; intestinal microbiota; diversity

昆虫肠道微生物主要包括细菌、真菌和病毒等, 受昆虫种类、生境以及取食等多种因素的影响,不同 昆虫的肠道微生物种群结构不同(陆秋成等, 2023)。这些微生物与宿主之间存在着复杂的相互 作用,并对宿主的新陈代谢和生理活动等产生重要 影响(周帆等,2020;Li et al.,2023)。近年来,随着 高通量测序技术的发展,昆虫肠道微生物的研究也 在不断深入。

肠道微生物与宿主之间的共生关系在动物中普 遍存在,蜜蜂作为一种营社会性群体生活的昆虫,相 比于其他独居生活的昆虫来说,其肠道微生物具有 特异性(王红芳和胥保华,2020)。以工蜂为主要研 究对象的试验结果表明,蜜蜂肠道的核心微生物共 包括9大类群,占全部微生物的95%以上,分别为 Gamma-1, Gamma-2, Beta, Alpha-1, Alpha-2.1, Alpha-2.2、Bifidobacterium、Firm-4和Firm-5类群(Moran et al., 2012; Sabree et al., 2012)。社会性蜜蜂新 生幼虫体内几乎没有细菌,整个生长过程中都由工 蜂喂养,这些相互作用可能导致细菌从蜂巢材料传 递到其肠道,以及某些种类的细菌从成年蜜蜂肠道 传递至新生蜜蜂体内(Martinson et al., 2012; Vojvodic et al., 2013; Hroncova et al., 2015)。独栖野生 蜜蜂幼虫在单独的虫室中发育,一般雌成虫将采集 到的花粉和花蜜与唾液腺分泌物混合制成蜂粮以合 适的质量放入虫室中供幼虫生长发育,雌成虫在蜂 粮制作过程中会释放一些抑制食物腐败和幼虫疾病 的真菌和细菌以保护幼虫健康生长(Gilliam et al.,

1984)。社会性蜜蜂共生细菌的传播依赖于群居蜜 蜂之间的接触,而独居蜜蜂共生细菌的传播主要依 赖于环境、巢粮和由亲本引入的筑巢材料(Lozo et al.,2015; Voulgari-Kokota et al.,2019a)。有研究表 明,独居蜜蜂幼虫的肠道菌群与花朵和育雏食物密 切相关,因此环境因素可以导致独居蜜蜂肠道内细 菌群落具有较高的多样性(Rothman et al.,2019; Voulgari-Kokota et al.,2019b)。

凹唇壁蜂 Osmia excavata 属于蜜蜂总科切叶蜂 科壁蜂属 Osmia, 是我国北方落叶果树的一种优良 传粉昆虫,具有耐低温、授粉效率高、管理简便以及 应用成本低等特点,近年来被广泛用于为水果和蔬 菜等作物传粉,尤其对樱桃和苹果的授粉及坐果增 产具有显著促进作用(曹衍斌等,2017;门兴元等, 2018;刘丽等,2019)。凹唇壁蜂营独栖生活,1年发 生1代,雌性的成虫活动期为30~45 d、卵期为3~4 d, 幼虫期为20~25 d、蛹期为25~30 d,于8-9月在茧 内羽化为成虫,以专性滞育状态越冬,翌年3月下旬 成虫陆续破茧出巢(窦飞越等,2022)。Liu et al. (2023)对不同地区凹唇壁蜂幼虫肠道及其巢土和巢 粮进行16SrRNA全长测序,发现不同地区的幼虫 肠道细菌群落具有相似性;蜂巢周围的环境因素,包 括温度、光照、降水、土壤湿度以及pH等都可能通过 影响筑巢材料和蜜源植物来影响凹唇壁蜂幼虫的肠 道微生物群。凹唇壁蜂有别于蜜蜂总科的蜜蜂和熊 蜂等社会性昆虫,其成虫在茧内生活长达7个月,这 个历程中壁蜂自身经历了由静到动的漫长变化过 程,在遗传信息和其他诱导因素的作用下,壁蜂开始 专性滞育的滞育期,滞育解除后进入静态的休眠期, 再接受外界环境刺激进入破茧期,自由活动于自然 界。迄今为止,尚未有关于凹唇壁蜂成虫在该生理 过程中其肠道菌群多样性及群落结构的研究报道。 鉴于肠道菌群对宿主的重要生物学意义,本研究采 用Illumina NovaSeq二代高通量测序技术对凹唇壁 蜂雌成虫肠道细菌进行分析,比较雌成虫滞育期、休 眠期和破茧期肠道细菌的群落结构和生物多样性差 异,并对肠道细菌的基因功能进行预测,以期为蜜蜂 总科筑巢独栖野生授粉蜂肠道菌群研究和此类野生 蜂保护生物学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:滞育期凹唇壁蜂成虫由山东省烟台 必丰农业科技有限公司提供,将其置于实验室内长 35 cm、宽 35 cm、高 35 cm的养虫笼中,在室温环境 下待其自然解除滞育并破茧而出后,分别取滞育期、 休眠期和破茧期雌成虫供试。

试剂和仪器:十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)试剂盒,中国 Nobleryder公司; Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix、NEBNext[®] Ultra[™] II FS DNA PCR-free Library Prep Kit(NEB/E7430L)建库试剂盒,美国 New England Biolabs公司;通用型 DNA 纯化回收试剂盒,天 根生化科技(北京)有限公司;其余试剂均为国产分 析纯。T100梯度 PCR 仪、PowerPac Basic 电泳仪,美 国 Bio-Rad公司; Illumina Novaseq 6000 测序仪,美 国 Illumina公司。

1.2 方法

1.2.1 凹唇壁蜂肠道样本获取及测序

采用CATB试剂盒对上述样本基因组DNA进行提取。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,取适量的合格样本DNA于离心管中,使用无菌水稀释至1 ng/µL,备用。采用引物341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和 806R(5'-GGAC-TACNNGGGTATCTAAT-3')对凹唇壁蜂的16S rRNA

V3~V4区域进行PCR扩增。扩增产物经2%琼脂糖 凝胶电泳检测后,使用通用型DNA纯化回收试剂盒 回收产物,使用NEBNext[®]Ultra[™]IIFSDNAPCRfree Library Prep Kit(NEB/E7430L)建库试剂盒进行 文库构建,确认文库检测合格后,使用NovaSeq 6000进行PE250上机测序。引物合成、PCR扩增、 建库和测序工作委托天津诺禾致源生物信息科技有 限公司完成。

1.2.2 肠道样本测序数据处理及物种组成分析

使用FLASH 1.2.11 软件对 1.2.1 每个样本的测 序 read 进行拼接,得到的拼接序列为原始数据(Magoč & Salzberg, 2011)。使用 fastp 0.23.1 软件对原 始数据进行严格的过滤处理,最终得到高质量数据 (Bokulich et al., 2013)。将高质量数据通过与物种 注释数据库 Silva 138.1 数据库进行比对检测嵌合体 序列,去除其中的嵌合体序列,得到最终的有效数据 (Edgar et al., 2011)。使用QIIME 2 2020.2 软件中的 DADA2模块对得到的有效数据进行降噪后获得扩 增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)以 及特征表(Wang et al., 2021)。使用QIIME 2 2020.2 软件的 classify-sklearn 算法对 ASV 进行物种注释, 检索数据库为Silva 138.1数据库,剔除注释到的叶 绿体和线粒体序列,绘制各物种的稀释曲线,分析肠 道菌群的物种组成,并计算各物种的相对丰度。

1.2.3 凹唇壁蜂肠道微生物多样性分析

使用QIIME 2 2020.2 软件计算凹唇壁蜂不同时 期雌成虫15个样本中肠道微生物的Alpha多样性指 数,包括Chaol指数、Goods coverage指数、Shannon 指数和Simpson指数,分析其在不同时期的差异;并 进行Beta多样性分析,主要检验不同样本之间群落 结构的相似性,即对肠道菌群进行聚类分析,构建样 本肠道菌群聚类树,聚类树展现了样本间的相似度, 样本之间的分支长度越短,样本之间越相似;同时使 用R 4.0.3软件基于加权 UniFrac 距离进行主坐标分 析(principal co-ordinates analysis, PCoA)和非度量多 维尺度(non-metric multi-dimensional scaling, NMDS) 分析,根据样本中包含的物种信息,以点的形式反映 在二维平面上,同时计算 Stress 值(反映 NMDS 分析 的质量信息),该值小于0.2表明NMDS分析结果准 确;使用QIIME 2 2020.2软件计算加权UniFrac距离 并采用非加权组平均(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)法构建聚类树,并将 聚类结果与各样本肠道菌群在门水平上的相对丰度 整合展示;通过LEfSe 1.1.01软件来完成样本组间

的显著差异物种分析,设置线性判别分析(linear discriminant analysis,LDA)阈值为4。

1.2.4 凹唇壁蜂肠道微生物功能预测分析

以Silva 138.1数据库序列为参考序列,采用 Tax4Fun 0.3.1软件对凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧 期的肠道菌群进行功能预测,并基于所有凹唇壁蜂 肠道菌群样本在京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据 库中的功能注释及丰度信息,选取相对丰度排名前 35的功能及其丰度信息绘制肠道菌群功能预测热 图并进行聚类。

1.3 数据分析

利用 Excel 2019 软件进行试验数据处理,采用 GraphPad Prism 8.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 t 检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 凹唇壁蜂雌成虫肠道样本测序结果

通过对凹唇壁蜂肠道15个样本测序 read 进行 剪切过滤,平均每个样品测得128444条 read,经过 质控平均得到112969条有效数据,质控有效率达 87.95%。稀释曲线显示,随着抽样序列数量的增 加,每组样本所观测到的物种数趋于平缓饱和,说明 本研究数据可靠,可以反应数据的真实性(图1)。





图1 凹唇壁蜂雌成虫滞育至破茧期肠道细菌组成稀释曲线

Fig. 1 Dilution curve of intestinal bacterial composition in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of *Osmia excavata*

将序列以100%的相似度聚类为ASV,共得到 2999个ASV,将其在Silva138.1数据库进行物种注 释,每个样品在不同分类阶元获得的ASV数目不 同。对比不同时期的雌成虫样本数据,发现从滞育 期雌成虫样本中获得的ASV数量最少,从休眠期雌 成虫样本中获得的ASV数量最多,但是休眠期和破 茧期雌成虫样本的ASV总数相差不大(表1)。从滞 育期至破茧期的凹唇壁蜂雌成虫肠道细菌菌群中共 检测到41门96纲198目325科637属,且各时期的 肠道菌群在不同分类阶元注释到的物种数不同,其 中破茧期成虫CB-5样品在门、纲、目、科4个分类阶 元所得到的注释数均略高于其他样品,有25门48纲 96目131科;而滞育期成虫D-2样品在门、纲、目、 科、属5个分类阶元的注释数均略低于其他样品(表1)。

2.2 凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群组成及相对丰度

凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群在门水平的组成中以 变形菌门为核心菌门,其在滞育期、休眠期和破茧 期雌成虫肠道菌群中的相对丰度分别为91.41%、 75.98%和85.27%,均大于75.00%;其余门包括厚壁 菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、放线菌门、脱磺杆菌门和 蓝菌门,在滞育期雌成虫肠道中的相对丰度分别为 6.27%、0.61%、0.67%、0.66%、0.01%和0.05%,在休眠 期雌成虫肠道中的相对丰度分别为14.83%、7.16%、 0.47%、0.60%、0.24%和0.03%,在破茧期雌成虫肠道 中的相对丰度分别为11.10%、1.16%、0.23%、0.65%、 0.05%和0.07%(图2-A)。其中休眠期凹唇壁蜂雌 成虫肠道内厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度均高于 滞育期和破茧期。

凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群在属水平的组成中以 Sodalis为核心菌属,其在滞育期、休眠期和破茧期 雌成虫肠道菌群中的相对丰度分别为74.66%、 59.65%和73.14%;其余属包括沃尔巴克氏体Wolbachia、假单胞菌属Pseudomonas、乳杆菌属Lactobacillus、另枝菌属Alistipes、拟杆菌属Bacteroides、罗 尔斯通氏菌属Ralstonia和肠球菌属Enterococcus, 在滞育期雌成虫肠道中的相对丰度分别为1.23%、 6.87%、0.89%、0%、0.17%、1.53%和0.32%,在休眠期 雌成虫肠道中的相对丰度分别为1.15%、6.30%、 0.03%、2.15%、2.54%、1.63%和0.67%,在破茧期雌 成虫肠道中的相对丰度分别为3.27%、2.53%、 4.85%、0.16%、0.27%、0.10%和0.74%(图2-B)。除 了Sodalis外,在3个时期相对丰度均在1.00%以上 的属还有假单胞菌属和沃尔巴克氏体。

结合物种组成及相对丰度结果可知,凹唇壁蜂

雌成虫在滞育期至破茧期肠道内的核心物种组成相 似,且不存在显著差异(图2)。

表1 凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群16S rRNA基因高通量测序基本信息

Table 1 High-throughput sequencing of intestinal microbiota 16S rRNA gene in female adults from diapause to

cocoon-breaking stage of Osmia excavata

样本 Sample	原始数据 Raw reads	有效数据 Valid reads	ASV数量 No. of ASVs	不同分类水平物种数量				
				No. of taxa at different taxonomic levels				
				门 Phylum	纲Class	目 Order	科Family	属 Genus
D-1	129 775	116 017	203	11	19	41	72	91
D-2	119 592	108 149	140	11	16	34	54	70
D-3	131 293	113 693	282	13	20	43	93	139
D-4	143 475	126 592	503	20	34	78	126	228
D-5	133 831	119 048	235	14	19	39	71	102
PD-1	132 609	117 027	316	13	19	46	81	138
PD-2	117 111	101 149	451	16	24	56	93	156
PD-3	125 848	111 513	572	20	38	73	125	204
PD-4	132 347	110 348	736	21	30	65	116	207
PD-5	99 257	82 531	375	17	32	58	104	172
CB-1	108 973	96 498	368	22	44	74	120	165
CB-2	142 932	123 878	502	20	36	66	129	193
CB-3	134 374	119 979	488	19	30	62	103	178
CB-4	133 853	118 606	366	17	29	55	103	161
CB-5	141 401	129 519	452	25	48	96	131	150

D: 滞育期; PD: 休眠期; CB: 破茧期。1~5为样本编号。D: Diapause period; PD: post-diapause period; CB: cocoonbreaking period. 1-5 are sample number.





Fig. 2 Relative abundance of intestinal microbiota structure at the phylum (A) and genus (B) levels in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of *Osmia excavata*

2.3 凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群多样性分析

2.3.1 α多样性分析

凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群的Goods_coverage指数均大于99.9%(图3-A),说明样本测序覆盖度高,测序结果基本能反映物种肠道微生物的真实情况。 凹唇壁蜂雌成虫不同时期的肠道菌群多样性明显不同,休眠期雌成虫肠道菌群的平均Chaol指数与破 茧期雌成虫相近,两者均大于滞育期雌成虫肠道菌 群的平均Chaol指数,表明休眠期和破茧期雌成虫 肠道菌群中物种数相似,而且均高于滞育期雌成虫 肠道菌群中的物种数(图3-B);休眠期雌成虫肠道 菌群的Shannon指数和Simpson指数均最高,表明 该时期肠道菌群的物种丰富度和均匀度最高,而滞 育期雌成虫肠道菌群的Shannon指数和Simpson指 数均最低,表明该时期肠道菌群的物种丰富度和均 匀度最低(图3-C~D)。综合分析发现休眠期雌成虫 的肠道细菌种类丰富,菌群多样性高,而滞育期和破 茧期其肠道细菌种类较少且多样性较低。

2.3.2 β多样性分析

凹唇壁蜂雌成虫休眠期与破茧期样本间注释到

门水平的菌群存在较大差异,而休眠期和破茧期样 本与滞育期各样本间的菌群差异较小;虽然不同样 本间肠道菌群相似度存在差异,但是所有样本注释 到门水平的菌群中,变形菌门均占据核心地位(图 4),这与2.2结果相吻合。



D: 滞育期; PD: 休眠期; CB: 破茧期。1~5为样本编号。D: Diapause period; PD: post-diapause period; CB: cocoon-breaking period. 1-5 are sample number.

图3 凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道细菌α多样性指数差异分析

Fig. 3 Analysis of α diversity index differences of intestinal bacteria in female adults from diapause to

cocoon-breaking stage of Osmia excavata

图中数据为平均数±标准差。*表示经*t*检验法检验两组样本间差异显著(*P*<0.05)。Data are mean±SD. * indicates significant difference between two sample groups by *t* test (*P*<0.05).



图4 凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群门水平等级聚类树和相对丰度

Fig. 4 Rank clustering tree and relative abundance histogram of intestinal microbiota at the phylum level in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of *Osmia excavata*

PCoA结果显示,凹唇壁蜂雌成虫从滞育期至

破茧期3个时期样本的肠道菌群物种组成结构相似

(图 5-A)。基于NMDS分析所得 Stress 值小于0.2, 说明 NMDS分析结果可以准确反映样本间的差异 程度,除个别样本外,滞育期、休眠期和破茧期样本 的加权 UniFrac 距离均较近,这3个时期凹唇壁蜂肠 道菌群大致聚类为一类(图 5-B),与 PCoA 结果一 致,表明凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群 群落结构相对稳定。





综上所述,凹唇壁蜂雌成虫滞育期到破茧期肠 道菌群的多样性存在差异,由滞育期到休眠期,肠道 内菌群多样性有明显升高的趋势,由休眠期到破茧 期,肠道内菌群多样性出现降低的趋势,同时破茧期 肠道菌群多样性高于滞育期,休眠期肠道菌群多样 性最复杂,细菌种类最丰富;滞育期至破茧期虽然其 肠道菌群丰度变化大,但是菌群结构稳定,物种组成 相似。

2.3.3 组间差异性肠道菌群

凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧时期肠道菌群差 异在门、纲、目、科、属水平均有显著变化,且显著差 异菌群出现在休眠期和破茧期。破茧期仅有1个显 著差异菌群,为乳杆菌属;而休眠期有10个显著差 异菌群,在门水平上显著差异菌群为拟杆菌门,在纲 水平上显著差异菌群为梭菌纲和拟杆菌纲,在目水 平上显著差异菌群为颤螺菌目、拟杆菌目和毛螺菌 目,在科水平上显著差异菌群为毛螺菌科和拟杆菌 科,在属水平上显著差异菌群为拟杆菌属和另枝菌 属(图6)。

2.4 凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群功能预测

凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期的肠道菌群功 能预测结果显示,其肠道菌群的功能主要集中在新陈 代谢、遗传信息处理和环境信息处理3个方面(图7)。

凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群的功能在3个时期存

在差异,滞育期肠道菌群的功能预测聚类到内分泌 系统、辅助因子和维生素代谢、脂质代谢、萜类和多 酮类代谢相关功能,相对丰度明显高于休眠期和破 茧期;休眠期肠道菌群的功能预测聚类到免疫系统、 聚糖的生物合成和代谢、复制和修复、核苷酸代谢、 碳水化合物代谢、细胞过程和信号传导、运输和分解 代谢、耐药性、翻译、其他次生代谢产物的生物合成 相关功能,相对丰度明显高于滞育期和破茧期;破茧 期肠道菌群的功能预测聚类到折叠、分类和降解和 遗传信息处理相关功能,相对丰度明显高于滞育期 和休眠期期(图8)。

3 讨论

随着分子生物学的发展,高通量测序技术已经 广泛应用于蜜蜂和熊蜂等社会性昆虫肠道微生物的 相关研究中(Martinson et al.,2011;Luo et al.,2020)。 张义强(2013)对意大利蜜蜂 Apis mellifera 各时期肠 道内共生菌的研究表明厚壁菌门及变形菌门为核心 菌群;徐龙龙等(2014)研究发现我国的兰州熊蜂 Bombus lantschouensis 肠道共生菌核心菌群为 Gilliamella apicola和 Snodgrassella alvi;郭军(2015)研 究结果显示东方蜜蜂 Apis cerana 肠道菌群的核心 菌群为变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门。 本研究结果表明,凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期 肠道内核心菌门为变形菌门,其余菌门为厚壁菌门、 拟杆菌门、梭杆菌门和放线菌门;核心菌属为Sodalis,其余菌属为假单胞菌属、沃尔巴克氏体和乳杆菌 属。群居的蜜蜂和熊蜂拥有一套简单、循环、相似的 肠道微生物群(Su et al.,2021)。本研究发现凹唇壁 蜂雌成蜂滞育期至休眠期肠道菌群的核心菌群与社 会性蜜蜂和熊蜂相似,但是核心菌属Sodalis却在凹 唇壁蜂雌成蜂中显著富集,可能与凹唇壁蜂独栖生 活相关。窦飞越等(2022)研究了凹唇壁蜂的营巢生物学特性,发现完成交配的部分雌成虫会选择并标记适合的巢管进行筑巢,采集花蜜(粉)制作蜂粮并完成产卵繁殖后代,整个生活史大部分时间生活在巢管内,没有社会性蜜蜂和熊蜂的蜂王及工蜂的抚育和饲养环节,不能通过饲喂和抚育行为将菌群直接传给后代。推断这可能是导致凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道内 Sodalis 菌群显著富集的原因。



A: LEfSe 条形图展示了 LDA 评分高于 4.0 的不同生命阶段的肠道菌群; B: LEfSe 分支图显示了肠道菌群在不同生命 阶段的系统发育分布。A: LEfSe bars show the gut flora at different life stages with linear discriminant analysis (LDA) scores higher than 4.0; B: LEfSe branching map shows the phylogenetic distribution of intestinal flora at different life stages.

图6 凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群的LEfSe分析

Fig. 6 LEfSe analysis of intestinal microbiota in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of Osmia excavata



Fig. 7 Relative abundance of intestinal microbiota function prediction in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of *Osmia excavata*

Sodalis作为内共生菌存在于多种昆虫体内,包括虱子、舌蝇、大青叶蝉Cicadella viridis和独居蜜蜂等,其共生的功能作用也各不相同(Rubin et al.,2018)。 Sodalis glossinidius作为舌蝇的内共生菌,存在于包括血淋巴、脂肪体和中肠在内的舌蝇组织的细胞间和细胞内,并且通过调节舌蝇免疫系统增强舌蝇对锥虫的易感性(Welburn & Maudlin,1991;1999; Dale & Maudlin,1999; Dale & Welburn,2001)。与海豹虱相关的Sodalis细菌内共生体的代谢模型被发现可合成类似于Candidatus Riesia的B族维生素(Boyd et al.,2016)。对独居苜蓿切叶蜂Megachile rotundata的细菌16S rRNA 基因进行测序也鉴定到了Sodalis(McFrederick et al.,2014)。练启仙等(2019)在大青叶蝉中分离出次生内共生菌Sodalis sp.,同时筛选出了减少其数量的抗生素。

本研究通过 Alpha 多样性分析发现凹唇壁蜂雌 成虫在休眠期的肠道菌群物种丰富度和多样性高, 推断可能与休眠期代谢活动的发生相关。昆虫滞育 解除后会伴随着大量的代谢活动发生(吴华静, 2018),肠道菌群可能直接或间接参与这些代谢活 动。本研究进一步对凹唇壁蜂雌成虫不同时期组间 肠道菌群差异进行分析,发现有10个显著差异菌群 出现在休眠期,这些菌群的存在可能为凹唇壁蜂雌 成虫生存发挥着重要的功能作用。Evans & Lopez (2004)研究结果表明某些肠道益生菌可以增强宿主 的免疫能力,诱导宿主产生的抗菌肽对病原菌有抵 抗作用,其中拟杆菌作为益生菌参与宿主的正常活 动,可抑制病原菌定殖(Li et al.,2017)。

作为独栖性蜜蜂总科的凹唇壁蜂,其成虫在茧

内生活长达7个月,经历了滞育期、休眠期和破茧 期,独特的生活特点使其肠道菌群的传递和功能也 有别于其他蜜蜂总科的社会性昆虫。本研究发现凹 唇壁蜂雌成虫从滞育到破茧而出的过程中,肠道菌 群的新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理3个 功能相关基因的相对丰度最高,这也从基因功能角 度揭示了该成虫发育阶段肠道菌群的特点:处于停 止进食状态的滞育期,成虫肠道菌群的活动和代谢 均维持在相对较低的水平,而达到滞育解除和破茧 阶段,成虫肠道菌群开始活跃起来,相关功能如体内 遗传信息处理和环境信息处理功能相关基因开始发 挥重要作用。

蜜蜂核心肠道菌群具有保守性和相对特异性, 使其成为一个研究肠道细菌的新兴模型,适用于研 究共生理论(李还原等,2019)。蜜蜂工蜂有一个简 单而具体的肠道微生物群,少数细菌种类主宰着蜜 蜂的肠道群落,蜜蜂肠道菌群为了解特定肠道菌群 组装的过程以及肠道菌群影响宿主生物学的途径提 供了机会(Martinson et al., 2012; Corby-Harris et al., 2014; Zheng et al., 2018)。基于本研究结果, 推测凹 唇壁蜂也可为研究独栖性授粉昆虫肠道菌群的组 成、结构和功能提供模式性帮助。Zhang et al.(2022) 研究发现蜜蜂肠道乳酸杆菌通过调节色氨酸代谢进 而调节宿主的学习记忆行为,由此推断驱动凹唇壁 蜂雌成虫肠道菌群变化和功能差异的主要因素是适 应外界环境的变化,在整个"菌群-脑-轴"适应过程 中,茧内的成虫度过滞育期、休眠期和破茧期时其肠 道内核心菌群也会发挥特定功能,调节其体内机能 来适应环境,保证其茧内成虫安全度过由静到动的 整个历程,这其中凹唇壁蜂雌成虫肠道菌群中核心菌属 Sodalis 细菌发挥着怎样的功能作用还需要进

一步研究验证。

	ſ			折叠、分类和降解 Folding, sorting and degradation	
	1			癌症 Cancer	相对丰度
				细胞活性 Cell motility	Relative
				神经系统 Nervous system	
ΗГ	-			转录 Transcription	0.5
	l			细胞生长与死亡	0.0
				Cell growth and death 免疫系统 Immune system	-0.5
				聚糖的生物合成和代谢	1.0
				Glycan biosynthesis and metabol	lism
				夏利和修复 Replication and rep	air
				核苷酸代谢 Nucleotide metabol	ism
ļЦ				碳水化合物代谢 Carbohydrate n	netabolism
				细胞过程和信亏传守 Cellular processes and signaling	transduction
				运输和分解代谢 Transport and	catabolism
				耐药性 Drug resistance	
				翻译 Translation	
	1			其他次级代谢物的生物合成	. 1 1.
,	_			Biosynthesis of other secondary: 内分泌系统 Endocrine system	metabolites
				酶家族 Enzyme families	
				内分泌和代谢疾病	
				Endocrine and metabolic disease	s
				遗传信息处理 Genetic informati	ion processing
11	[信号转导 Signal transduction	
יוו	-			膜运输Membrane transport	
				细胞群落-原核生物 Cellular community-prokarvotes	
Ц				神经退行性疾病 Neurodegenera	tive diseases
	ſ			辅因子和维生素代谢	mina
[1			新陈代谢 Metabolism	unnis
				氨基酸代谢 Amino acid metabo	lism
				传染病 Infectious diseases	113111
				异生素生物降解和代谢	
L				Xenobiotics biodegradation and	metabolism
				老化Aging	
	4			能量代谢 Energy metabolism	
				共地気塗散的代谢 Metabolism of other amino acids	5
				特征不佳 Poorly characterized	
				脂质代谢 Lipid metabolism	
				萜类和多酮类代谢	1.1.7.1
L	滞育期 Diapause period	休眠期 Post-diapause period	破茧期 Cocoon-breaking period	ivietabolism of terpenoids and po	biyketides

组别 Group

图8 凹唇壁蜂雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群的功能预测聚类热图

Fig. 8 Clustering heat map of intestinal microbiota function prediction in female adults from diapause to cocoon-breaking stage of *Osmia excavata*

本研究基于16SrRNA高通量测序对凹唇壁蜂 雌成虫滞育期至破茧期肠道菌群结构及多样性进行 了分析,明确了茧内雌成蜂不同时期肠道菌群组成、 群落结构变化以及不同发育阶段的核心菌群。进一 步分析发现,茧内成虫由静到动的整个历程中肠道 菌群功能不同,推断整个历程其肠道菌群为适应外 界环境变化和凹唇壁蜂独特的进食特点而产生多样 性差异;肠道菌群还与其体内相关激素、酶类和免疫 调控反应等变化相联动,参与感知环境信号、辅助宿 主内分泌系统以及帮助宿主昆虫免疫防御功能的细 菌大量参与该生理过程。

参考文献 (References)

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight

R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nature Methods, 10: 57–59

- Boyd BM, Allen JM, Koga R, Fukatsu T, Sweet AD, Johnson KP, Reed DL. 2016. Two bacterial genera, *Sodalis* and *Rickettsia*, associated with the seal louse *Proechinophthirus fluctus* (Phthiraptera: Anoplura). Applied and Environmental Microbiology, 82(11): 3185–3197
- Cao YB, Zhou XH, Ye BH, Li LL, Lu ZB, Xu H, Li WQ, Yu Y, Men XY. 2017. Factors limiting *Osmia excavata* Alfken populations in apple orchards in Shandong Province. Chinese Journal of Applied Entomology, 54(4): 652–659 (in Chinese) [曹衍斌, 周仙 红, 叶保华, 李丽莉, 卢增斌, 徐衡, 李文强, 于毅, 门兴元. 2017. 山东苹果园凹唇壁蜂种群的制约因子分析. 应用昆虫学 报, 54(4): 652–659]
- Corby-Harris V, Snyder LA, Schwan MR, Maes P, McFrederick QS, Anderson KE. 2014. Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. Applied and Environmental Microbiology, 80(24): 7460–7472
- Dale C, Maudlin I. 1999. Sodalis gen. nov. and Sodalis glossinidius sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly Glossina morsitans morsitans. International Journal of Systematic Bacteriology, 49(Pt1): 267–275
- Dale C, Welburn SC. 2001. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. International Journal for Parasitology, 31(5/6): 628–631
- Dou FY, Li HY, Song HT, Kou RM, Zhou ZY, Luo AR, Huang DY.
 2022. Nesting biology of *Osmia excavata* Alfken (Hymenoptera: Megachilidae). Journal of Environmental Entomology, 44(1):
 184–193 (in Chinese) [窦飞越, 李红英, 宋海涛, 寇若玟, 周泽 扬, 罗阿蓉, 黄敦元. 2022. 凹唇壁蜂的营巢生物学研究. 环境 昆虫学报, 44(1): 184–193]
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27(16): 2194–2200
- Evans JD, Lopez DL. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology, 97(3): 752–756
- Gilliam M, Buchmann S, Lorenz B. 1984. Microbial flora of the larval provisions of the solitary bees, *Centris pallida* and *Anthophora* sp. Apidologie, 15(1): 1–10
- Guo J. 2015. Diversity and influencing factors of gut microbiota in honey bees. PhD thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [郭军. 2015. 蜜蜂肠道菌群多样性 及其影响因素研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Doskocil I, Tyl J, Kamler M, Titera D, Hakl J, Mrazek J, Bunesova V, et al. 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PLoS ONE, 10(3): e0118707
- Li HY, Dong ZX, Chen YF, Guo J. 2019. Advances in research of colonization of gut microbiota in the honeybee. Microbiology China,

46(11): 3091-3101 (in Chinese) [李还原, 董志祥, 陈奕霏, 郭 军. 2019. 蜜蜂肠道菌群定殖研究进展. 微生物学通报, 46 (11): 3091-3101]

- Li YZ, Chang LY, Xu K, Zhang SH, Gao FJ, Fan YS. 2023. Research progresses on the function and detection methods of insect gut microbes. Microorganisms, 11(5): 1208
- Li ZC, Deng HM, Zhou YZ, Tan YF, Wang XY, Han YP, Liu YY, Wang Y, Yang RF, Bi YJ, et al. 2017. Bioluminescence imaging to track *Bacteroides fragilis* inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* infection in mice. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7: 170
- Lian QX, Liu JF, Yang MF, Zhou XY, Wu G, Luo T, Cen YH. 2019. Effect of three antibiotics on the removal of endosymbionts of *Cicadella viridis* (Hemiptera: Cicadellidae). Journal of Environmental Entomology, 41(3): 650–656 (in Chinese) [练启仙, 刘健锋, 杨茂发, 周小芸, 吴广, 罗亭, 岑怡红. 2019. 三种抗生素去除大 青叶蝉内共生菌的效果. 环境昆虫学报, 41(3): 650–656]
- Liu L, Li LL, Ouyang F, Li C, Yu Y, Qu CH, Qu ZL, Ye BH, Men XY. 2019. Fruit-setting, yield increase and economic value evaluation for cherry pollination by *Osmia excavata* Alfken in Shandong Province. Shandong Agricultural Sciences, 51(5): 125–128 (in Chinese) [刘丽, 李丽莉, 欧阳芳, 李超, 于毅, 曲诚怀, 曲在 亮, 叶保华, 门兴元. 2019. 山东省凹唇壁蜂为樱桃授粉坐果增 产及经济价值评估. 山东农业科学, 51(5): 125–128]
- Liu WP, Li Y, Lu HH, Hao YJ, Zhang K, Dang XQ, Fan XD, Zhang H, Zhou ZY, Zhu CD, et al. 2023. Diversity of bacterial communities associated with solitary bee *Osmia excavata* Alfken (Hymenoptera: Megachilidae). Applied Sciences, 13(3):1524
- Lozo J, Berić T, Terzić-Vidojević A, Stanković S, Fira D, Stanisavljević L. 2015. Microbiota associated with pollen, bee bread, larvae and adults of solitary bee *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae). Bulletin of Entomological Research, 105(4): 470–476
- Lu QC, He HG, Pu DQ. 2023. Research progress on species and functions of intestinal microorganisms in insects. Sichuan Agricultural Science and Technology, (2): 48-52 (in Chinese) [陆秋成, 何恒果, 蒲德强. 2023. 昆虫肠道微生物种类及其功能研究进 展. 四川农业科技, (2): 48-52]
- Luo ZW, Dong ZX, Chen YF, Li HY, Tang QH, Li JL, Guo J. 2020. Comparative analysis of the gut microbiota of *Apis cerana* in Yunnan using high-throughput sequencing. Archives of Microbiology, 202(9): 2557–2567
- Magoč T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics, 27(21): 2957–2963
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran NA. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Molecular Ecology, 20(3): 619–628
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Applied and Environmental Microbiology, 78(8): 2830–2840

- McFrederick QS, Mueller UG, James RR. 2014. Interactions between fungi and bacteria influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281(1779): 20132653
- Men XY, Li LL, Lu ZB, Ouyang F, Liu L, Xu H, Yu Y. 2018. Biological characteristics and pollination service of mason bee. Chinese Journal of Applied Entomology, 55(6): 973–983 (in Chinese) [门 兴元,李丽莉,卢增斌,欧阳芳,刘丽,徐衡,于毅. 2018. 壁蜂生物学特性与传粉服务功能. 应用昆虫学报, 55(6): 973–983]
- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE, 7(4): e36393
- Rothman JA, Andrikopoulos C, Cox-Foster D, McFrederick QS. 2019. Floral and foliar source affect the bee nest microbial community. Microbial Ecology, 78(2): 506–516
- Rubin BER, Sanders JG, Turner KM, Pierce NE, Kocher SD. 2018. Social behaviour in bees influences the abundance of *Sodalis* (Enterobacteriaceae) symbionts. Royal Society Open Science, 5(7): 180369
- Sabree ZL, Hansen AK, Moran NA. 2012. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. PLoS ONE, 7(7): e41250
- Su QZ, Wang QL, Mu XH, Chen H, Meng YJ, Zhang X, Zheng L, Hu XS, Zhai YF, Zheng H. 2021. Strain-level analysis reveals the vertical microbial transmission during the life cycle of bumblebee. Microbiome, 9(1): 216
- Vojvodic S, Rehan SM, Anderson KE. 2013. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars. PLoS ONE, 8 (8): e72106
- Voulgari-Kokota A, Grimmer G, Steffan-Dewenter I, Keller A. 2019a. Bacterial community structure and succession in nests of two megachilid bee genera. FEMS Microbiology Ecology, 95(1): fiy218
- Voulgari-Kokota A, McFrederick QS, Steffan-Dewenter I, Keller A. 2019b. Drivers, diversity, and functions of the solitary-bee microbiota. Trends in Microbiology, 27(12): 1034–1044
- Wang HF, Xu BH. 2020. The relationship between gut microflora and

sociality of honeybee. Biotechnology Bulletin, 36(2): 71-76 (in Chinese) [王红芳, 胥保华. 2020. 蜜蜂肠道微生物与其社会性的关系. 生物技术通报, 36(2): 71-76]

- Wang YY, Guo H, Gao XG, Wang JH. 2021. The intratumor microbiota signatures associate with subtype, tumor stage, and survival status of esophageal carcinoma. Frontiers in Oncology, 11: 754788
- Welburn SC, Maudlin I. 1991. *Rickettsia*-like organisms, puparial temperature and susceptibility to trypanosome infection in *Glossina morsitans*. Parasitology, 102(2): 201–206
- Welburn SC, Maudlin I. 1999. Tsetse-trypanosome interactions: rites of passage. Parasitology Today, 15(10): 399–403
- Wu HJ. 2018. Biological oxidation characteristics of the silkworm, Bombyx mori during diapause initiation. Master thesis. Suzhou: Soochow University (in Chinese) [吴华静. 2018. 滞育发动阶段 家蚕卵的生物氧化特性. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学]
- Xu LL, Wu J, Guo J, Li JL. 2014. Dynamic variation of symbionts in bumblebees during hosts growth and development. Scientia Agricultura Sinica, 47(10): 2030–2037 (in Chinese) [徐龙龙, 吴杰, 郭军, 李继莲. 2014. 共生菌群在熊蜂生长发育过程中的动态 变化. 中国农业科学, 47(10): 2030–2037]
- Zhang YQ. 2013. The study of the symbiotic bacteria in honeybee intestinal tract. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [张义强. 2013. 蜜蜂肠道共生菌 的研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Zhang ZJ, Mu XH, Cao QN, Shi Y, Hu XS, Zheng H. 2022. Honeybee gut *Lactobacillus* modulates host learning and memory behaviors via regulating tryptophan metabolism. Nature Communications, 13: 2037
- Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, Moran NA. 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. Lab Animal, 47: 317–325
- Zhou F, Pang ZC, Yu XQ, Wang XY. 2020. Insect gut microbiota research: progress and applications. Chinese Journal of Applied Entomology, 57(3): 600-607 (in Chinese) [周帆, 庞志倡, 余小 强, 汪肖云. 2020. 昆虫肠道微生物的研究进展和应用前景. 应 用昆虫学报, 57(3): 600-607]

(责任编辑:李美娟)