# 白马蝠蛾与云南蝠蛾微生物群落多样性 与功能预测比较分析<sup>\*</sup>

孙 涛<sup>1,2\*\*</sup> 汤德相<sup>1,2</sup> 代永东<sup>1</sup> 赵志远<sup>1</sup> 张灿明<sup>3</sup> 虞 泓<sup>1\*\*\*</sup>
 (1. 云南大学生态与环境学院云百草实验室,昆明 650500; 2. 云南大学生命科学学院,昆明 650500;
 3. 宜康宝生物科技有限公司,香格里拉 674400)

【目的】 研究并比较冬虫夏草 Ophiocordyceps sinensis (Berk.) Sung et al.寄主白马蝠蛾 Hepialus 摘要 baimaensis Liang 和云南蝠蛾 Hepialus yunnanensis Yang, Li et Shen 体内微生物群落组成及其功能差异,初 步分析蝠蛾体内微生物群落对冬虫夏草菌侵染蝠蛾的影响。【方法】 对白马蝠蛾(Hb)和云南蝠蛾(Hy) 4-5 龄期幼虫内微生物进行 Ion S5<sup>TM</sup>XL 高通量测序,并利用生物信息学软件对细菌和真菌群落分别进行群 落组成、LefSe(LDA Effect Size)、功能预测分析和比较分析。【结果】 Hb 组细菌共鉴定 17 门 145 属; Hy 组细菌共鉴定 23 门 202 属。Hb 组细菌中肉杆菌属 Carnobacterium 相对丰度占比最高,为 95.55%; Hy 组细菌中沃尔巴克氏体 Wolbachia 占主要比例(85.28%)。Hb 组真菌共鉴定 4 门 114 属; Hy 组真菌共 鉴定 5 门 113 属。Hb 组真菌中假裸囊菌属 Pseudogymnoascus 为最优势属(46.23%), Hy 组真菌中菌刺孢 属 Mycocentrospora 为最优势属 (37.87%)。LefSe 分析 Hb 组中有 5 个细菌分类单元和 12 个真菌分类单元 与 Hy 组具有显著差异,而 Hy 组中有 7 个细菌分类单元和 9 个真菌分类单元与 Hb 组具有显著差异。两 组样本细菌群落进行 COG 功能预测,Hb 组更偏向氨基酸转运与代谢功能,而Hy 组更偏向翻译、线粒体 的结构与发生功能。两组样本细菌群落进行 KEGG 功能预测, Hb 组中 DNA 解旋酶、ATP 结合区和 ABC 转运蛋白丰度较高, Hy 组中辅酶 Q 还原酶、推定转座酶和核糖体丰度较高。真菌群落 FUNGuild 分析, Hb 组中 46.26%的真菌属于动物病原菌-土壤腐生真菌类别; 而 Hy 组占比最高真菌类别为植物病原菌 (38.31%)。两组真菌样本进行 KEGG 和 MetaCyc pathway 功能预测,两组样本中真菌功能丰度较高的类 别均与基础代谢或生理功能相关。【结论】 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫体内细菌和真菌组成及其功 能存在一定差异,而与其它寄主蝠蛾相比,白马蝠蛾 4-5 龄期幼虫内细菌和真菌组成存在相同的类群。本 研究发现,白马蝠蛾4-5龄期幼虫内优势菌属肉杆菌属和假裸囊菌属很可能在冬虫夏草寄主蝠蛾生长发育、 冬虫夏草侵染等过程中发挥重要作用。

关键词 冬虫夏草;白马蝠蛾;云南蝠蛾;微生物群落;高通量测序

# Comparison of microbial community diversity and function in Hepialus baimaensis and Hepialus yunnanensis larvae

SUN Tao<sup>1, 2\*\*</sup> TANG De-Xiang<sup>1, 2</sup> DAI Yong-Dong<sup>1</sup> ZHAO Zhi-Yuan<sup>1</sup> ZHANG Can-Ming<sup>3</sup> YU Hong<sup>1\*\*\*</sup>

Yunnan Herbal Laboratory, School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, China;
 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China;
 YiKangBao Biotech Co., Ltd., Shangri-La 674400, China)

**Abstract** [Objectives] To compare the microbial community composition and function of *Hepialus baimaensis* Liang and *H. yunnanensis* Yang, Li et Shen, and to investigate the influence of the microbial community on the infection of *H.* 

<sup>\*</sup>资助项目 Supported projects: 生态环境部项目(2019HJ2096001006); 国家自然科学基金(31870017); 云南省科技厅项目 [2018FY001(-006)]; 云南大学研究生科研创新项目(2020269)

<sup>\*\*</sup>第一作者 First author, E-mail: lyrsuntao@163.com

<sup>\*\*\*</sup>通讯作者 Corresponding author, E-mail: hongyu@ynu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-04-21; 接受日期 Accepted: 2021-08-25

baimaensis by Ophiocordyceps sinensis (Berk.) Sung et al.. [Methods] The microbial 16S rRNA and internal transcribed space (ITS) of 4th and 5th instar larvae of *H. baimaensis* and *H. yunnanensis* were sequencing using the Ion S5<sup>TM</sup>XL high-throughput sequencing method. The community composition of these species, LefSe (LDA effect size), predicted community function and comparative analysis of bacteria and fungi, were carried out using bioinformatics analysis software. [Results] Seventeen phyla and 145 genera of bacteria were identified in *H. baimaensis*, and 23 phyla and 202 genera in *H.* yunnanensis. In H. baimaensis, 95.55% of bacteria species belonged to the dominant genera Carnobacterium, whereas Wolbachia was the dominant genera (85.28%) in H. yunnanensis. Four phyla and 114 fungal genera were identified in H. baimaensis, and 5 phyla and 113 genera in H. yunnanensis. Pseudogymnoascus was dominant fungal genera (46.23%) in H. baimaensis, whereas Mycocentrospora was the dominant genera (37.87%) in H. yunnanensis. LefSe analysis indicates that the 5 bacterial taxa and 12 fungal taxa found in *H. baimaensis* were significantly different to those found in *H. yunnanensis*. The 7 bacterial taxa and 9 fungal taxa in H. yunnanensis were also significantly different to those in H. baimaensis . COG analysis of the bacterial communities indicates that most bacteria are involved in amino acid transport and metabolism in H. baimaensis, whereas most are involved in translation, ribosomal structure and biogenesis in H. yunnanensis. Bacterial KEGG function predicted that the most common microbial functions were associated with DNA helicase, the ATP-binding cassette and ABC transporters in H. baimaensis, and with NADH: Ubiquinone reductase (H (+)-translocating), putative transposase and ribosome in H. yunnanensis. A FUNGuild analysis of fungal community indicates that 46.26% of all fungi originated from animal pathogen-soil saprotrophs in H. baimaensis. However, in H. yunnanensis, 38.31% of fungi originated from plant pathogens. KEGG and MetaCyc pathway function prediction indicates that the majority of fungi are related to basic metabolic, or physiological, functions. [Conclusion] The bacterial and fungal communities of 4th and 5th instar H. baimaensis and H. yunnanensis larvae were entirely different and there were also some differences in the functions of these communities between species. The bacterial and fungal communities of H. baimaensis larvae were the same as those of other hosts of O. sinensis, whereas the corresponding communities in H. yunnanensis were not. Carnobacterium and Pseudogymnoascus were, respectively, the dominant bacterial and fungal genera in H. baimaensis, and could play important roles in both larval growth and development, and in infection by O. sinensis.

Key words Ophiocordyceps sinensis; Hepialus baimaensis; Hepialus yunnanensis; microbial community; high-throughput sequencing

冬虫夏草 Ophiocordyceps sinensis (Berk.) Sung et al.是冬虫夏草菌寄生寄主蝠蛾幼虫,以 寄主蝠蛾幼虫为主要营养来源生长发育的虫生 真菌。冬虫夏草具有重要的药用价值和经济价 值。研究表明,冬虫夏草具有提高机体免疫力、 抗肺癌和肝癌等功能疗效(Sung et al., 2007; 杨大荣等, 2009; 张德利等, 2017; 韩日畴等, 2019; Dai et al., 2020)。冬虫夏草的药用价值 给其产地带来了巨大经济效益,但由于大量采 挖,冬虫夏草野生资源逐渐匮乏,生长环境遭到 严重破坏,致使寄主蝠蛾及食物数量减少。导致 野生冬虫夏草产量已不能满足市场需求。因此, 保护冬虫夏草寄主蝠蛾栖居的生态环境和人工 繁育冬虫夏草是保护冬虫夏草工作的必然选择。

寄主蝠蛾的饲养繁殖是人工培育冬虫夏草的基础。目前,已知冬虫夏草寄主蝠蛾约63种,

主要分布在我国西藏、四川、青海和云南等高海 拔地区(邱乙等, 2015; 林阳步等, 2019)。寄 主蝠蛾幼虫是冬虫夏草菌的主要营养来源,也是 人工培育冬虫夏草成功与否的关键性因素之一, 决定着人工培育冬虫夏草的品质和产量(韩日筹 等,2019)。在冬虫夏草寄主识别中,早期由于 研究条件等限制,研究人员认为白马蝠蛾 Hepialus baimaensis Liang 和云南蝠蛾 Hepialus yunnanensis Yang, Li et Shen 均是冬虫夏草寄主 (杨大荣等, 1991, 1992); 但 Dai 等 (2019) 通过广泛采样对冬虫夏草寄主蝠蛾进行谱系地 理分析,并未发现云南蝠蛾作为冬虫夏草寄主的 实例, 推测云南蝠蛾可能并非冬虫夏草寄主。这 说明冬虫夏草菌对这 2 种蝠蛾的感染可能存在 一定差异。在寄生物对宿主的寄生过程中微生物 群落发挥重要作用,例如蝗虫肠道中的微生物能

够产生抗真菌酚类物质,从而抑制肠道中真菌孢 子萌发(Dillon and Charnley, 1995)。此外,昆 虫肠道内微生物能够保护宿主免受其他有害微 生物影响(Hurst and Jiggins, 2000; Broderick *et al.*, 2006)。由此可以推测 2 种遗传相近的蝠 蛾,是否能被冬虫夏草寄生,可能与二者体内的 微生物群落有关。

本研究通过对冬虫夏草寄主白马蝠蛾体内 微生物群落多样性及其功能进行研究,并与寄主 云南蝠蛾体内微生物群落组成及功能进行比较, 探究不同寄主体内微生物群落对冬虫夏草菌侵 染蝠蛾产生的影响,为人工培育冬虫夏草寄主蝠 蛾的选育工作提供参考,这将有助于阐明冬虫夏 草菌侵染机制。

## 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

所用白马蝠蛾和云南蝠蛾均为人工繁育的 4-5 龄期幼虫,该龄期幼虫为冬虫夏草菌侵染龄 期。白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫样本来自 云南香格里拉市宜康宝生物科技有限公司蝠蛾 养殖基地(海拔:3260m;27.83°E,99.70°N)

# 1.2 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内微生 物总 DNA 提取

将白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫浸泡于 75%浓度酒精中 3 min 后,在浓度为 30%的双氧 水浸泡 5 min,然后用无菌水漂洗 3 次以进行样 本表面消毒(Li *et al.*,2021)。按照 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒(Qiagen,德国)方法提取 白马蝠蛾(Hb)和云南蝠蛾(Hy)4-5 龄期幼虫 体内微生物总 DNA,每组样本 3 个生物学重复。 提取出的微生物总 DNA 进行 1%琼脂糖凝胶电 泳检测,并用 NanoDrop 2000 超微量紫外分光光 度计(Thermo Scientific,美国)测定 DNA 浓度。

## 1.3 PCR 扩增白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼 虫内微生物

以白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内微生物总 DNA 为扩增模板,通用引物 515F 和 806R

扩增细菌 16s rRNA V4 区域基因片段(Liao *et al.*, 2014),通用引物 2024F 和 2409R 扩增真菌 ITS2 区域基因片段(Toju *et al.*, 2012)。PCR 扩增体系如下:总 DNA 10 ng,浓度 10 µmol·L<sup>-1</sup>的上下游引物各 1 µL, 2 × Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix 15 µL(New England Biolabs,英国),双蒸无菌水加至 30 µL。扩增程序为:98 ℃预变性 1 min;98 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 45 s, 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。

#### 1.4 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序

将 PCR 产物进行 2%的琼脂糖凝胶电泳检 测,使用 GeneJET 胶回收试剂盒(Thermo Scientific,美国)进行回收。回收产物根据 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns(Thermo Scientific,美国)建库试剂盒方法构建文库,使 用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 定量系统(Promega,美国) 进行定量和文库质量检测。按照 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序 仪(Thermo Scientific,美国)要求进行上机测序。

#### 1.5 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序结果数据分析

利用 Fastp 软件(Version 0.20.0, https://github. com/OpenGene/fastp)(Chen *et al.*, 2018)和 FLASH (http://www.drive5.com/usearch/manual/ chimera\_formation.html)软件(Magoč *et al.*, 2011)对 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序得到的 Reads 序列进 行质控和拼接,得到有效序列(Clean reads)。 利用 Uparse(Version 7.1, http://www.drive5.com/ uparse/)软件(Edgar, 2013)在97%相似度水平 下对 Clean reads 进行 OTU (Operational taxonomic unit)聚类(Stackebrandt and Goebel, 1994),并选取出现频数最高的序列为 OTUs 代 表序列。

根据 OTU 聚类结果,利用 RDP Classifier (Version 2.2, https://sourceforge.net/projects/rdpclassifier/)软件进行物种注释分析(Wang *et al.*, 2007),在域、界、门、纲、目、科、属、种不 同分类水平统计各样本群落组成。利用 Mothur (Version 1.30.2, https://www.mothur.org/wiki/ Downl)软件进行 Chao 指数、Ace 指数、Shannon 指数以及 Simpson 指数等 Alpha 多样性指数分析 (Rogers *et al.*, 2016)。利用 LefSe (LDA Effect Size)分析软件(http://huttenhower.sph.harvard. edu/galaxy/root?tool\_id=lefse\_upload)进行组间 具有显著性差异影响的群落或物种分析(Chen *et al.*, 2018)。利用 PICRUSt2(Version 1.0, https://github.com/vaulot/pr2\_datab)软件进行 16S rRNA 序列的 COG (Clusters of Orthologous Groups)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)功能预测分析(Hidalgo *et al.*, 2020)。利用 FunGuild (Version 1.0, http://www. funguild.org/)软件(Nguyen *et al.*, 2016)和 PICRUSt2(Version 1.0, https://github.com/vaulot/ pr2\_datab)软件(Park *et al.*, 2020)进行真菌功 能预测。

# 2 结果与分析

#### 2.1 OTU 数目及序列数据统计

细菌 16S rRNA: Hb 组共检测到 192 158 条 序列, Hy 组共检测到 248 930 条序列, OTU 分 析注释按最小样本序列数抽平,即按样本 Hb 组 347 994 条序列数抽平; 真菌 ITS: Hb 组共检测 到 222 502 条序列, Hy 组共检测到 168 036 条序 列,OTU分析注释同样按最小样本序列数抽平,即按样本 Hb 组 352 843 条序列数抽平。抽平后 Hb 组和 Hy 组香农稀释曲线趋于平稳且 6 个样本覆盖率(Coverage)≥99.74%,证明抽平后样本数据量足以反映绝大多数微生物信息(图 1: A,B)(表 1)。

# 2.2 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内细菌 群落组成

基于 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序鉴定 Hb 组和 Hy 组样 本细菌组成,其中 Hb 组共鉴定到 17 门 145 属; Hy 组共鉴定到 23 门 202 属。

Hb 组中厚壁菌门 Firmicutes 占比最高 (96.42%),其次为变形菌门 Proteobacteria,占 比 1.57%,其余各门占比不超过 1%。而 Hy 组细 菌组成与 Hb 组明显不同,以变形菌门占比最高 (91.69%),其次为放线菌门 Actinobacteriota (4.44%)和厚壁菌门(2.25%)。通过两组鉴定 出的细菌门水平可以看出 Hb 组和 Hy 组细菌组 成具有较大差异,且硝基螺菌门 Nitrospirota 1 门 仅在 Hb 组中被鉴定到,而髌杆菌门 Patescibacteria、粘球菌门 Myxococcota、纤维杆 菌门 Fibrobacterota 等7门仅在 Hy 组中被鉴定到 (图 2: A)。





A. Hb 组和 Hy 组细菌香农稀释曲线; B. Hb 组和 Hy 组真菌香农稀释曲线。 A. Shannon curve of bacteria in Hb and Hy; B. Shannon curve of fungi in Hb and Hy.

	Tuble 1 - Tripin diversity of Successi and Tangi in Tib and Try					
微生物	样本	香农指数	辛普森指数	Ace 指数	Chao 指数	覆盖率
Microorganisms	Samples	Shannon index	Simpson index	Ace index	Chao index	Coverage
细菌 Bacteria	Hb1	1.03	0.736 7	297	303	0.999 1
	Hb2	0.62	0.794 3	138	134	0.999 4
	Hb3	0.49	0.842 4	150	152	0.999 3
	平均值 Average	0.71	0.791 1	195	196	0.999 3
	Hy1	3.44	0.096 4	523	524	0.998 6
	Hy2	2.33	0.217 5	281	289	0.998 6
	Hy3	2.17	0.335 1	414	423	0.998 4
	平均值 Average	2.65	0.216 0	406	412	0.998 5
真菌 Fungi	Hb1	2.67	0.149 7	170	178	0.997 8
	Hb2	2.83	0.091 0	141	152	0.997 8
	Hb3	2.84	0.108 9	158	185	0.997 6
	平均值 Average	2.78	0.116 3	159	178	0.997 7
	Hy1	2.92	0.117 9	176	181	0.997 7
	Hy2	2.17	0.217 9	100	119	0.998 6
	Hy3	2.98	0.093 1	202	236	0.997 4
	平均值 Average	2.69	0.143 0	156	171	0.997 9

表 1 Hb 组和 Hy 组细菌和真菌 Alpha 多样性指数 Table 1 Alpha diversity of bacteria and fungi in Hb and Hy

在 Hb 组中共鉴定 145 属细菌,其中肉杆菌 属 Carnobacterium 占比最高,为 95.55%,其次 为 Alkanindiges ( 4.31% )、粘液杆菌属 *Mucilaginibacter* (2.56%)、类诺卡氏属 Nocardioides (1.74%) 和冢村菌属 Tsukamurella (1.30%), 且有 1.26%的 OTUs 未能鉴定到属。 而 Hy 组中鉴定到 202 属细菌,其中占比最高细 菌为沃尔巴克氏体 Wolbachia,占比 85.28%,其 次为叶杆菌属 Phyllobacterium 占 1.91%、肉杆菌 属占1.73%和微杆菌属 Microbacterium 占1.17%, 且有 2.74%的 OTUs 未能鉴定到属 (图 2: B)。 对比 Hb 组和 Hy 组, 2 组最优势菌属不同, 且 在占比较高的细菌属类别中,仅肉杆菌属同时在 2组中出现,其他占比较高细菌属均不相同。而 且, 在 Hb 组中鉴定到 Ellin6055、 Methylobacterium-Methylorubrum、鞘氨醇菌属 Chitinophaga 等 43 个属, 而在 Hy 组中没有; 在 Hy 组中鉴定到脱醌菌种属 Demeguina、下水道 球菌属 Amaricoccus、Bauldia 等 100 个属, 而在

Hb 组中没有。

## 2.3 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内真菌 群落组成

基于 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序鉴定 Hb 组和 Hy 组真 菌组成,其中 Hb 组共鉴定到 4 门 114 属; Hy 组共鉴定到 5 门 113 属。在 Hb 组和 Hy 组中, 相 对 丰 度 占 比 最 高 的 真 菌 门 为 子 囊 菌 门 Ascomycota,分别为 94.58%和 83.50%,其次为 担子 菌门 Basidiomycota (Hb: 3.46%; Hy: 10.73%)和未分门类真菌 (Hb: 1.87%; Hy: 5.67%),表明 2 组样本门水平真菌群落组成相 似,但在 Hy 组中罗兹菌门 Rozellomycota 被鉴 定到,而在 Hb 组中没有 (图 2; C)。

Hb 组共鉴定到 114 属真菌,其中假裸囊菌属 Pseudogymnoascus 为最优势属,占比 46.23%, 其次为未分属类真菌占 18.76%、虫草属 Cordyceps 占 11.64%、假丝酵母属 Candida 占 4.01%、树粉孢属 Oidiodendron 占 3.49%。而 Hy



图 2 Hb 组和 Hy 组微生物群落组成

Fig. 2 Composition of microorganism communities in the Hb and Hy

A. 细菌门水平群落组成; B. 细菌属水平群落组成; C. 真菌门水平群落组成;
 D. 真菌属水平群落组成。图 B 和图 D 中列出排名前 20 属名。

 A. Composition of bacterial communities at the phylum; B. Composition of bacterial communities at the genus;
 C. Composition of fungal communities at the phylum; D. Composition of fungal communities at the genus. The names of top 20 genera were listed in Fig. B and Fig. D.

组共鉴定到 113 属真菌,其中菌刺孢属 Mycocentrospora为最优势属,占比 37.87%,其 次短梗蠕孢属 Trichocladium 占 14.74%、未分属 类真菌占 10.72%、Piskurozyma 占 6.73%、 Pseudeurotium 占 5.56%。对比 Hb 组和 Hy 组, 2 组样本优势菌属组成完全不同,且许多属只在其中一组中被鉴定到,如 Pycnora、热链球菌属 Mycothermus、头梗霉属 Cephaliophora 等 42 属 仅在 Hb 组中被鉴定到; Chaetosphaeronema、尾 孢菌属 Cercospora、Cystobasidium 等 41 属仅在 Hy 组中被鉴定到, 但 2 组未分属类真菌丰度相 对占比均较高(图 2: D)。

## 2.4 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内细菌 和真菌 Alpha 多样性分析

在 6 个细菌样本中, Hb 组除 Hb1 样本的 Ace 指数和 Chao 指数略高于 Hy2 样本,其余两样本 均低于 Hy 组各样本,表明 Hb 组细菌群落丰富 度相对低于 Hy 组样本; Hb 组的香农指数显著 低于 Hy 组,而辛普森指数极显著高于 Hy 组, 表明 Hb 组群落多样性低于 Hy 组,辛普森指数 相对高于 Hy 组也表明 Hb 组优势种集中程度相 对高于 Hy 组(表 1,图 3)。

在 6 个真菌样本中, Hb 组样本 Ace 指数和 Chao 指数与 Hy 组接近,平均值略低于 Hy 组; Hb 组的香农指数平均值略高于 Hy 组,而辛普 森指数平均值略低于 Hy 组,表明 Hb 组群落多 样性略高于 Hy 组,辛普森指数低于 Hy 组则表 明 Hb 组优势种集中程度低于 Hy 组(表 1,图 4)

## 2.5 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内细菌 和真菌群落 LefSe 分析

利用 LefSe 以 LDA 值  $\geq$  4.0 从门水平至属水 平进行 Hb 组和 Hy 组两组间差异微生物群落分 析,如图 5 所示,在 Hb 组中有 1 个细菌门(厚 壁 菌 门 ),1 个 细 菌 科 (肉 杆 菌 科 Carnbacteriaceae),1 个细菌属(肉杆菌属),和 3 个真菌科(假散囊菌科 Pseudeurotiaceae、黏毛 菌 科 Myxotrichaceae 和 麦 角 菌 科 Clavicipitaceae),3 个真菌属(假裸囊菌属、树 粉孢属和细梗霉属 *Leptobacillium*)与 Hy 组具有 显著差异的微生物群落(图 5)。其中,肉杆菌 属在 Hb 组的平均相对丰度较高,为 95.55%,而 在 Hy 组为 1.73%; 假裸囊菌属、树粉孢属和



图 3 Hb 组和 Hy 组细菌 Alpha 多样性指数箱图 Fig. 3 The boxplots of Alpha diversity of bacteria in Hb and Hy

A. Hb 组和 Hy 组细菌香农指数箱图; B. Hb 组和 Hy 组细菌辛普森指数箱图;

C. Hb 组和 Hy 组细菌 Ace 指数箱图; D. Hb 组和 Hy 组细菌 Chao 指数箱图。

A. The Shannon index boxplots of bacteria in Hb and Hy; B. The Simpson index boxplots of bacteria in Hb and Hy; C. The Ace index boxplots of bacteria in Hb and Hy; D. The Chao index boxplots of bacteria in Hb and Hy.





A. Hb 组和 Hy 组真菌香农指数箱图; B. Hb 组和 Hy 组真菌辛普森指数箱图;
C. Hb 组和 Hy 组真菌 Ace 指数箱图; D. Hb 组和 Hy 组真菌 Chao 指数箱图。
A. The Shannon index boxplots of fungi in Hb and Hy; B. The Simpson index boxplots of fungi in Hb and Hy; C. The Ace index boxplots of fungi in Hb and Hy; D. The Chao index boxplots of fungi in Hb and Hy.

Leptobacillium 在 Hb 组的平均相对丰度分别为 46.23%、3.49%和 0.03%, 而在 Hy 组分别为 1.17%、0.23%和 0。

在 Hy 组中也存在与 Hb 组具有显著差异的 微生物群落,包括 1 个细菌门(变形菌门),2 个细菌科(无形体科 Anaplasmataceae 和根瘤菌 科 Rhizobiaceae),1 个细菌属(沃尔巴克氏体), 和 2 个真菌科(球腔菌科 Mycosphaerellaceae 和 中国毛壳菌科 Chaetomiaceae),3 个真菌属(菌 刺孢属、短梗蠕孢属和 Pseudeurotium)(图 5)。 沃尔巴克氏体在 Hy 组平均相对丰度占比较高, 为 85.28%,而在 Hb 组中占比较低,仅为 0.02%; 在 Hy 组 中 菌 刺 孢 属 、短 梗 蠕 孢 属 和 Pseudeurotium 的平均相对丰度分别为 37.87%、 14.74%和 5.56%,而在 Hb 组中仅占 1.07%、0.05% 和 0.03%。

#### 2.6 白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄期幼虫内微生 物群落功能预测

2.6.1 白马蝠蛾和云南蝠蛾4-5龄期幼虫内细菌 群落功能预测 利用 PICRUSt2 对 Hb 组和 Hy 组样本进行 COG 功能预测,如图 6 所示,两组 样本未知功能细菌群落丰度均较高,且 Hb 组细 菌群落功能与 Hy 组有明显差异。Hb 组中,氨 基酸转运与代谢功能丰度较高,碳水化合物运输 和代谢功能次之;而 Hy 组中,翻译、线粒体的 结构与发生功能丰度较高,复制、重组和修复功 能丰度仅次于前者。

利用 PICRUSt2 对 Hb 组和 Hy 组样本进行 KEGG 功能预测,如图 7(A)所示,①Hb 组中 DNA 解旋酶、蛋白质-N(pi)-磷酸组氨酸-糖磷酸 转移酶和 DNA 指导的 DNA 聚合酶等酶的丰度





A. 细菌群落 LefSe 分析柱状图和分支图; B. 真菌群落 LefSe 分析柱状图和分支图。
 A. The histogram and cladogram of LefSe analysis of bacterial communities;
 B. The histogram and cladogram of LefSe analysis of fungal communities.

相对较高;而 Hy 组中辅酶 Q 还原酶、DNA 指导的 DNA 聚合酶和 RNA 指导的 DNA 聚合酶等 酶的丰度相对较高。基于 Hb 组和 Hy 组细菌群 落 KEGG 酶丰度热图对比分析发现, 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶、脱氧核糖核酸酶 I 和镉运出 ATP 酶等酶在 Hb 组中丰度较高但在 Hy 中较低;辅 酶 Q 还原酶、RNA 指导的 DNA 聚合酶和 L-苏 氨酸醛缩酶等酶在 Hy 组中丰度较高但在 Hb 组 中较低。②基于 KO (KEGG Orthology)丰度热 图可知, Hb 组中 ATP 结合区、蔗糖-6-磷酸酶和 2 型转运系统 ATP 结合蛋白等丰度较高;而 Hy 组中推定转座酶、转座酶和 RNA 指导的 DNA 聚合酶等丰度较高。对两组 KO 热图进行比较发 现, PTS 系统甘露糖特异性 IIB 组分、6-磷酸- β-葡萄糖苷酶和寡肽转运系统底物结合蛋白在 Hb 组丰度较高,而在 Hy 组较低;而 Hy 组中 RNA 指导的 DNA 聚合酶、转座酶 K07486 和苏 氨酸醛缩酶丰度较高,在 Hb 组丰度较低(图7: B)。③对 KEGG 代谢通路丰度热图进行分析, Hb 组中 ABC 转运蛋白、氨基酸的生物合成和碳 代谢等丰度较高;Hy 组中核糖体、氨基酸的生 物合成和碳代谢等丰度较高。对比两组 KEGG 代谢通路丰度发现,淀粉和蔗糖代谢、磷酸转移 酶系统(PTS)和半乳糖代谢在 Hb 组丰度较高, 而在 Hy 组丰度相对较低;而氧化磷酸化、细菌 分泌系统和卟啉与叶绿素代谢在 Hy 组丰度较 高,在 Hb 组丰度相对较低(图7:C)。对比两 组细菌群落的 KEGG 功能预测,两组在酶、KO





A. Hb 组 COG 功能丰度柱图; B. Hy 组 COG 功能丰度柱图; C. Hb 组和 Hy 组 COG 功能丰度对比图。
 A. Abundance column diagram of COG function of bacterial communities in the Hb;
 B. Abundance column diagram of COG function of bacterial communities in the Hy;
 C. Abundance comparison chart of COG function of bacterial communities in the Hb and Hy.

和代谢通路上均存在较大差异。

2.6.2 白马蝠蛾和云南蝠蛾4-5龄期幼虫内真菌 群落功能预测 基于 FUNGuild(Fungi functional guild)数据库对 Hb 组和 Hy 组真菌群落来源进 行归类预测,如图 8 所示,Hb 组中动物病原菌-土壤腐生真菌相对丰度最高,为 46.26%,其次 为未定义腐生真菌占比 24.52%和动物病原菌-内 生麦角菌-寄生真菌占比 11.65%;而 Hy 组中植 物病原菌相对丰度最高,为 38.31%,其次为未 定义腐生真菌占比 28.81%和未知类别占比 14.36%。由此可见,两组样本真菌来源存在一定 差异。

利用 PICRUSt2 对 Hb 组和 Hy 组样本进行 KEGG 功能预测分析, Hb 组中 ATP 酶、葡聚糖

α-1,4-葡萄糖水解酶和 L-阿拉伯糖异构酶等酶 的丰度较高;而 Hy 组中 ATP 酶、L-阿拉伯糖异 构酶和葡聚糖α-1,4-葡萄糖水解酶等酶的丰度 较高(图9:A)。利用 PICRUSt2 对 Hb 组和 Hy 组样本进行 MetaCyc pathway 功能预测分析, Hb 组有氧呼吸第 I 阶段(细胞色素 c)(酵母) (PWY-7279)和棕榈酸生物合成第 I 阶段(动 物和真菌)(PWY-5994)等代谢通路丰度较高(图 9:B); Hy 组有氧呼吸第 I 阶段(细胞色素 c)、 有氧呼吸第 II 阶段(细胞色素 c)(酵母)和脂 肪酸β氧化(过氧化物酶体、酵母)(PWY-7288) 等代谢通路丰度较高。由此可见,两组真菌群落 功能具有一定的相似性,但丰度略有不同。

Α			DNA指导的DNA聚合酶 DNA-directed DNA polymerase DNA解旋酶 DNA helicase NADH: 泛醌还原酶(H(+)-易位) NADH: Ubiquinone reductase (H(+)-translocating) 蛋白质-N(pi)-磷酸组氨酸-糖磷酸转移酶 Protein-N(pi)-phosphohistidinesugar phosphotransferase 组氨酸激酶 Histidine kinase 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶 6-phospho-beta-glucosidase RNA指导的DNA聚合酶 RNA-directed DNA polymerase DNA定向RNA聚合酶 DNA-directed RNA polymerase	
			內丽和加茲爾(乙酯和後多) Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)	
			谷氨酰胺基tRNA合酶(谷氨酰胺水解) Glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)	
			天门冬氨酰tRNA合成酶(谷氨酰胺水解)	
			Asparaginy1-trivA synthase (glutamine-nydroty2ing) 极性氨基酸转运ATP酶 Polar-amino-acid-transporting A	ГРаѕе
			H(+)-转运双扇区ATP H(+)-transporting two-sector A 半時気酸脱硫酶 Cuctaing desulfurase	TPase
			中加氨酸脱硫酶 Cystelle desultatee DNA拓扑异构酶 DNA topoisomerase 磷酸核糖甲酰甘氨	電酸合酶
			Phosphoribosylformylglycinamidine synthase	
			该储核政府们 Ribonuclease H 硫氧还蛋白二硫还原酶 Thioredoxin-disulfide reductase	
			肽基脯氨酰异构酶 Peptidylprolyl isomerase	
			Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-indepen	ndent)
			DNA-(无嘌呤或无嘧啶位点)裂解酶 DNA-(apurinic or apurimidinic site) lyage	
			DNA拓扑异构酶(ATP水解)DNA topoisomerase (AT	P-hydrolyzing)
			二氢脂酰脱氢酶 Dihydrolipoyl dehydrogenase 核糖核苷二磷酸还原酶Ribonucleoside-diphosphate redu	ctase
			氨甲酰磷酸合酶(谷氨酰胺水解)	
			Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) I型位点特异性脱氢核糖核酸酶 Type I site-specific dec	oxvribonuclease
			苯丙氨酸tRNA连接酶 PhenylalaninetRNA ligase	
			过氧化物还原蛋白 Peroxiredoxin 23srma假尿苷(1911/1915/1917)合酶	
			23S rRNA pseudouridine(1911/1915/1917) synthase	
			· 辆制出ATP酶 Cadmium-exporting ATPase · 锌输出ATP酶 Zinc-exporting ATPase	
			甘氨酸tRNA连接酶 GlycinetRNA ligase	
			上-孔酸脱氢酶L-lactate denydrogenase 甘油-3-磷酸1-O-酰基转移酶	
			Glycerol-3-phosphate 1-O-acyltransferase	5.5-
			3-判机盔-[机盔+(冲虽口] 应示两 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	
			苏氨酸醛缩酶 L-threonine aldolase	5.0-
			乙酰辅酶A羧化酶Acetyl-CoA carboxylase	
			乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase 丝氨酸型D-ala-D-ala羧肽酶	4 5-
			Serine-type D-ala-D-ala carboxypeptidase	
			细胞色素c氧化酶 Cytochrome-c oxidase 谷氨酸氨连接酶 Glutamateammonia ligase	4.0-
			位点特异性DNA甲基转移酶(腺嘌呤特异性)	1.0
			Site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific) 4-羟基-四氢二吡啶酸合酶	3.5
			4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	5.5
			東口間致限時政時 Froten-tyrosine-phosphatase 核糖-5-磷酸异构酶 Ribose-5-phosphate isomerase	3.0
			β-半乳糖苷酶 Beta-galactosidase 肽去甲酰化酶 Pentide deformulase	5.0
			NADH脱氢酶 NADH dehydrogenase	25
	TH		│二氢脂酰赖氨酸残基乙酰转移酶 Dihydrolinovllysine-residue acetyltransferase	2.5
	Hb	Ну	2 mj alompo jinjomo rostano novijinimistoraso	

组别 Group name

в			ATP结合盒,B亚家族,细菌		
_			ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial		
			假定转座酶 Putative transposase		
			蔗糖-6-磷酸酶 Sucrose-6-phosphatase		
			ABC-2型转运系统ATP结合蛋白		
			LacI家族转录调节因子 LacI family transcriptional regulator		
			6-磷酸-β-葡萄糖苷酶 6-phospho-beta-glucosidase		
			RNA定向DNA聚合酶 RNA-directed DNA polymerase		
			ABC-2型牧运系统透展蛋白 ABC-2 type transport system permease protein		
			推测的ABC转运系统通透性蛋白		
			Putative ABC transport system permease protein		
			转座酶 Transposase		
			PTS system, cellobiose-specific IIC component		
			推测的ABC转运系统ATP结合蛋白		
			Putative ABC transport system ATP-binding protein		
			DNA修复蛋白KadC DNA repair protein KadC 极性氨基酸转运系统底物结合蛋白		
			Polar amino acid transport system substrate-binding protein		
			极性氨基酸转运系统 ATP结合蛋白		
			Polar amino acid transport system ATP-binding protein	mthaca	
			硫氧还蛋白还原酶(NADPH) Thioredoxin reductase (NADPH)	)	
			冷休克蛋白(β丝带,CspA家族)		
			Cold shock protein (beta-ribbon, CspA family)		
			DNA 解旋時II/ATP 依赖性DNA 解旋時 Pcr & DNA helicase II / ATP-dependent DNA helicase Pcr &		
			二氢脂酰胺脱氢酶 Dihydrolipoamide dehydrogenase		
			23srma假尿苷1911/1915/1917合酶		
			23S rRNA pseudouridine1911/1915/1917 synthase 會世妹完秀始底伽姓合巫白		
			Sが知識の相合度は     Oligopeptide transport system substrate-binding protein		
			Cd2+/Zn2+-输出ATPase Cd2+/Zn2+-exporting ATPase		
			脱硫酵素 Cysteine desulfurase		
			工业研究数 Tu elongation factor Tu L-乳酸脱氢酶 L-lactate dehydrogenase		
			PTS系统,甘露糖特异性 IIB组分		
			PTS system, mannose-specific IIB component		
			版/辗转运系统版物结合蛋白 Pentide/nickel transport system substrate-binding protein		
			3-氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶		
			3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase		
			办 因 酸 怪 缩 冊 Threonine aldolase W 刑 分 娰 奚 兹 蛋 白 VirB6		
			Type IV secretion system protein VirB6		
			非特征蛋白质 Uncharacterized protein		
			铁复合物转运系统通透性蛋白		
			极性氨基酸转运系统透膜蛋白		
			Polar amino acid transport system permease protein		
			谷氨酰胺合成酶 glutamine synthetase		
			4-拧莖-四氢呃啶敢盲酶 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase		
			可能的磷酸甘油酸变位酶	5.5 -	
			Probable phosphoglycerate mutase		
			蛋白酪氨酸磷酸酶 Protein-tyrosine phosphatase 肽去甲酰化酶 Pentide deformylase	5.0	
			酰基载体蛋白 Acyl carrier protein	5.0 -	
			D-蛋氨酸转运系统底物结合蛋白		
			D-methionine transport system substrate-binding protein 丙酮酚脱氨酶F2组分(一氨胎酶胺乙酰转移酶)	4.5 -	
			Pyruvate dehydrogenase E2 component		
			(dihydrolipoamide acetyltransferase)	10	
			D- 街	4.0 -	
			D-蛋氨酸转运系统ATP结合蛋白		
			D-methionine transport system ATP-binding protein	3.5 -	
			信号版酶 I Signal peptidase I PNA 聚合酶gigma 70 因子,FCF亚安族		
			RNA polymerase sigma-70 factor. ECF subfamily		
			推测的谷氨酰胺转移酶 Putative glutamine amidotransferase	3.0 -	
			能量耦合因子转运系统ATP结合蛋白		
			Ellergy-coupling factor transport system AIP-binding protein 能量耦合因子转运系统诱膜蛋白	2.5 -	
			Energy-coupling factor transport system permease protein		
	Hb	Ну			

组别 Group name

С			氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	
			ABC运输公司 ABC transporters	
			核糖体 Ribosome	
			碳代谢 Carbon metabolism	
			嘌呤代谢 Purine metabolism	
			嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	
			群体感应 Quorum sensing	
			双组分系统 Two-component system	
			氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	
			糖酵解/糖异生 Glycolysis / Gluconeogenesis	
			淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	
			氢酰tRNA生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	
			氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolis	m
			丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	
			磷酸转移酶系统(PTS) Phosphotransferase system (PTS)	
			肽聚糖生物合成 Pentidoolycan biosynthesis	
			细菌分泌系统 Bacterial secretion system	
			同源重组 Homologous recombination	
			甘氨酸 丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine serine and threenine metabo	liem
			当然我、些父亲和你的父亲们的 Gryenie, serine and inferiorine metabolism	115111
			2-每代羰基酚代谢 2-Oxocathoxylic acid metabolism	
			<sup>2</sup> -氧化烷基酸化物 2-0x0carboxyne actu inclusionsin 戊糖磷酸诠谷 Pentose phosphate pathway	
			法招牌股还任 Tentose phosphate pathway 结职修复 Mismatch renair	
			相能修及 Misinaton repair	
			下行版 Galactose metabolism 页复验 于久复龄和公复龄代谢 Alening aspertote and alutemate a	notabolism
			的复数、八个实版和中实版门砌 Alaline, aspartate and glutamate in 控權輸進环(TCA循环) Citrate avale (TCA avale)	letabolisili
			们像随循环(ICA循环)(IIIale Cycle (ICA Cycle)	
			本裙和日路裙行例 Fluctose and mannose metabolism	
			DNA复制 DNA replication	
			尿核生物的恢回足速程 Carbon Inxation pathways in prokaryous	
			蛋白灰面口 Protein export	
			积氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	6.6
			内酸化物 Propanoate metabolism	
			脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	64
			中烷代谢 Methane metabolism	0.1
			细胞向别-圣什困 Cell cycle - Caulobacter	62
			乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.2
			脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	60
			百油解脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	0.0
			RNA)律將 RNA degradation	<b>5</b> 0
			β-内既胺酮约性 Beta-lactam resistance	5.8
			帖奕王链生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	
			光合生物的固体作用 Carbon fixation in photosynthetic organisms	5.6
			精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	
			一个叶酸碳池 One carbon pool by folate	5.4
			之酸料辅酶A生物合成 Pantothenate and CoA biosynthesis	
			基低切除修复术 Base excision repair	5.2
			」酸代谢 Butanoate metabolism	
			光合作用 Photosynthesis	5.0 -
			甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	
			◎本内氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	4.8
	Hb	Ну	Prenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	

#### 组别 Group name

#### 图 7 Hb 组和 Hy 组细菌群落 KEGG 功能丰度热图

#### Fig. 7 Abundance heatmap of KEGG function of bacterial communities in the Hb and Hy

A. Hb 组和 Hy 组细菌群落酶功能丰度热图; B. Hb 组和 Hy 组细菌群落 KO 功能丰度热图;

C. Hb 组和 Hy 组细菌群落代谢通路丰度热图。

A. Enzymes abundance heatmap of bacterial communities in the Hb and Hy; B. KO functions abundance heatmap of bacterial communities in the Hb and Hy; C. Pathways abundance heatmap of bacterial communities in the Hb and Hy.



图 8 Hb 组和 Hy 组真菌群落 FUNGuild 功能相对丰度柱状图

#### Fig. 8 Relative abundance histogram of FUNGuild function of fungal communities in the Hb and Hy

А	H	3		右氨哌哌 I (細胞魚素。)
	DNA定向DNA聚合酶			有氧叮吸I (细胞已系C) Aerobic respiration I (cytochrome c)
	DNA-directed DNA polymerase			有氧呼吸II(细胞色素c)(酵母)
	DNA解旋酶 DNA helicase			Aerobic respiration II (cytochrome c) (yeast)
				标酮酸生物合成 1 (动物和真菌)
	NADH: (乙酰亞原酶 $(H(+)-初位)$ ) NADH: [Ibiquinone reductase $(H(+)-translocating)$			Paimitate biosynthesis I (animals and fungi) 些肪酸 amp: heta-每化 ( 过每化物酶休 酵母 )
	White a ( ) There are the three and the second			Fatty acid & beta:-oxidation (peroxisome, yeast)
	蛋日质-N(pi)-磷酸组氨酸-糖磷酸转移酶 Protein-			乙醛酸循环 Glyoxylate cycle
	N(p1)-phosphohistidine-sugar phosphotransferase			D-肌醇(1,4,5)-三磷酸生物合成
	组氨酸激酶 Histidine kinase			D-myo-inositol (1,4,5)-trisphosphate biosynthesis
	6-磷酸-β-葡萄糖苷酶 6-phospho-beta-glucosidase			马甘核甘酸降解 Ⅱ Guanosine nucleotides degradation Ⅱ
	RNA定向DNA聚合酶 RNA-directed DNA polymerase			戊糖磷酸涂径(非氧化分支)
	DNA定向RNA聚合酶 DNA-directed RNA polymerase			Pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)
	丙酮酸脱氢酶 (乙酰转移)			TCA循环II(植物和真菌)
	Pyruvate dehvdrogenase (acetyl-transferring)			TCA cycle II (plants and fungi)
				甲基酮生物合成 Methyl ketone biosynthesis
	行致既放荃IKINA ra 時(行致既放小肼) Glutaminul tPNA synthese (glutamine hydrolyzing)			甘露糖生物合成
	Tid the first part A white ( (A) first the later )			GDP-mannose biosynthesis
	大门冬氨酰tRNA合成酶(谷氨酰胺水解)			腺苷核糖核苷酸从头生物合成
	Asparaginyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)			Adenosine ribonucleotides de novo biosynthesis
	极性氨基酸转运ATP酶			KNA表致 KNA Charging 丙酮酸发酵生产员丁醇(丁君)
	Polar-amino-acid-transporting ATPase			Pyruvate fermentation to isobutanol (engineered)
	H(+)-转运双扇区ATP酶			腺苷核苷酸从头生物合成的超通路 I
	H(+)-transporting two-sector ATPase14			Superpathway of adenosine nucleotides de novo
	半胱氨酸脱硫酶 Cysteine desulfurase			biosynthesis l 立硷其 I型其他在在山上版人式
	DNA 拓扑员构酶 DNA tongisomerase			辛酸基-[酰基软件蛋白]生物合成   (线粒体 酵母 )
	が 必 般 な 練田 融 士  気 融  ム  施 か  し れ  、  し い  、  し い  、  し い  、  し い  、  し い  、  し い  、  し  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、			Octanovl-[acvl-carrier protein] biosynthesis
	一种政权储中航日			(mitochondria, yeast)
				L-缬氨酸生物合成 L-valine biosynthesis
	核糖核酸酶H Ribonuclease H			腺苷核苷酸从头生物合成的超通路Ⅱ _ 0 8
	硫氧还蛋白二硫还原酶 Thioredoxin-disulfide reductase			Superpathway of adenosine nucleotides de novo
	肽基脯氨酰异构酶 Peptidylprolyl isomerase			biosynthesis II
	磷酸甘油酸变位酶(2,3-二磷酸甘油酯非依赖性)			L-丝氨酸和日氨酸生物合成的超级通道 1 Supermethyway of Learing and gluging biogenethesis I
	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-			糖原生物合成II(来自IDP-D-葡萄糖)
Hh Hy	independent)	Hh	Hv	Glycogen biosynthesis II (from UDP-D-glucose)
们如 Group pag	ma	相別で		
和力 Uroup na		组劢 研	oup name	

图 9 Hb 组和 Hy 组真菌群落功能丰度排名前 20 热图

#### Fig. 9 Abundance heatmap of top 20 functions of fungal communities in the Hb and Hy

A. Hb 组和 Hy 组真菌群落酶功能丰度排名前 20 热图; B. Hb 组和 Hy 组真菌群落 Metacye 代谢通路丰度排名前 20 热图。

A. Top 20 enzymes abundance heatmap of fungal communities in the Hb and Hy;

B. Top 20 metacye pathways abundance heatmap of fungal communities in the Hb and Hy.

## 3 讨论

目前已知冬虫夏草寄主蝠蛾多分布于我国 西藏、云南、青海和甘肃等青藏高原及横断山脉 地区,鲜有分布于不丹、尼泊尔等国家喜马拉雅 山脉地区,具有典型区域分布、不同种狭窄分布 等分布规律(邱乙等, 2015;林阳步等, 2019)。 云南省共分布 23 种冬虫夏草寄主蝠蛾(杨大荣 等,2009;邱乙等,2015),早期研究认为白马 蝠蛾和云南蝠蛾均是冬虫夏草寄主(杨大荣等, 1991, 1992)。而最新研究表明,云南蝠蛾可能 并不是冬虫夏草寄主 (Dai et al., 2019), 在宜 康宝生物科技有限公司蝠蛾养殖基地进行人工 冬虫夏草侵染过程中也发现,云南蝠蛾几乎不能 被冬虫夏草菌所侵染,且无法长出人工子实体。 人工培育冬虫夏草是解决野生冬虫夏草资源稀 缺和保护冬虫夏草等问题最直接有效的方法,但 人工培育冬虫夏草难度较大,目前尚不能大量获 得。其中,寄主蝠蛾的选育是人工培育冬虫夏草 的关键问题之一,但寄主蝠蛾幼虫期较长,一般 3-6年完成一个世代(韩日畴等, 2019), 使得冬 虫夏草寄主蝠蛾研究和选育工作更为困难。本研 究选择相对容易侵染且可获得品质较好冬虫夏 草的寄主白马蝠蛾为研究对象,基于 Ion S5<sup>TM</sup>XL 测序平台对人工繁育的白马蝠蛾和云南蝠蛾 4-5 龄幼虫样本进行高通量测序,对测序结果进行微 生物群落组成、组间差异微生物群落以及微生物 群落功能预测分析,获得白马蝠蛾 4-5 龄幼虫体 内微生物群落多样性及其重要功能,并与云南蝠 蛾进行比较,分析 2 种人工繁育蝠蛾幼虫体内微 生物群落组成差异及微生物群落的功能差异,探 究蝠蛾体内微生物群落对冬虫夏草菌侵染蝠蛾 可能具有的影响。

对人工繁育白马蝠蛾进行细菌群落多样性 分析发现,细菌群落丰富度和多样性较低而优势 种集中程度较高,门水平中相对丰度 96.42%皆 为厚壁菌门,属水平中 95.55%皆为肉杆菌属, 其他类群相对丰度较低。刘莉等(2008)利用变 性梯度凝胶电泳法对冬虫夏草寄主贡嘎蝠蛾 Hepialus gonggaensis 进行肠道细菌多样性研究 时也发现,肉杆菌属丰富度较高为优势菌属之 一。穆冬冬等(2010)将从贡嘎蝠蛾体内分离的 肉杆菌属优势菌株作为食品添加剂饲喂贡嘎蝠 蛾4龄期幼虫,得到该肉杆菌属优势菌株具有促 进寄主蝠蛾生长、调节肠道菌群平衡等作用的相 关结果(表 2)。而云南蝠蛾细菌群落相对丰度 最高的门水平和属水平类群分别是变形菌门 (91.69%)、沃尔巴克氏体(85.28%),而厚壁菌 门相对丰度仅为 2.25%, 肉杆菌属相对丰度仅为 1.73%。对赤眼蜂 Trichogramma spp.中的沃尔巴 克氏体研究时发现,体内没有沃尔巴克氏体的赤 眼蜂寿命较长且羽化率较高(付海滨等,2005)。

Tab	Table 2         The information of advantage genera of Hepialus baimaensis and Hepialus yunnanensis						
宿主 Host	属名 Genus name	相对丰度(%) Relative abundance (%)	主要来源 Main sources	主要功能 Main functions	参考文献 References		
白马蝠蛾 Hepialus	肉杆菌属 Carnobacterium	95.55	肉、鱼、家禽以及 湖泊等	&胃肠道菌群,某些物种具有 抑制有害病菌功能	Hammes and Hertel, 2006		
baimaensis	假裸囊菌属 Pseudogymnoascus	46.23	土壤	耐低温、耐盐,某些物种能 够产生抗氧化、抗病毒次级 代谢物	栏Zhang <i>et al.</i> , &2016;郭永智等, 2019		
云南蝠蛾 Hepialus yunnanensis	沃尔巴克氏体 Wolbachia	85.28	节肢动物	控制宿主的繁殖,包括诱导 生殖不亲和、孤雌生殖和雌 性化	¥Werren, 1997 È		
	菌刺孢属 Mycocentrospora	37.87	蔬菜、花卉及胞囊 线虫	長守致蔬菜和观赏植物病害等 多种病害	達傅俊范等, 1994		

表 2 白马蝠蛾与云南蝠蛾优势菌属信息表 able 2 The information of advantage genera of *Hepialus baimaensis* and *Hepialus vunnane* 

由此可见,沃尔巴克氏体很可能会对云南蝠蛾生 长发育具有影响(表2)。

对人工繁育白马蝠蛾进行真菌群落多样性 分析发现,真菌群落的优势种集中程度比细菌群 落低,相对丰度最高的门水平类别为子囊菌门 (94.58%),相对丰度最高的属水平类别为假裸 囊菌属(46.23%),其次为未分属类真菌(18.76%) 和虫草属(11.64%)。假裸囊菌属为一类嗜低温 真菌,嗜低温真菌为适应极端环境形成了与其他 真菌不同的生理代谢特征,同时产生了许多特殊 次级代谢物,而这些代谢物通常具有抗病毒、抗 氧化等活性(Zhang et al., 2016; 郭永智等, 2019)。赵静雯(2014)采用纯培养方法在冬虫 夏草中也分离到了该真菌。由此可以推测, 假裸 囊菌属真菌很可能在冬虫夏草寄主蝠蛾生长发 育、冬虫夏草侵染等过程中发挥了重要作用(表 2)。但在云南蝠蛾体内相对丰度仅为1.17%,这 很可能与云南蝠蛾分布海拔相对较低而白马蝠 蛾分布海拔相对较高有关,该结果也表明,假裸 囊菌属真菌很可能在冬虫夏草寄主蝠蛾生长发 育、冬虫夏草侵染等过程中发挥了重要作用。在 云南蝠蛾样本中,相对丰度最高的门水平类别为 子囊菌门(83.50%),相对丰度最高的属水平类 别为菌刺孢属(37.87%),与白马蝠蛾真菌群落 组成具有明显区别,且菌刺孢属是一类能够导致 蔬菜和观赏植物病害的真菌(傅俊范等,1994) (表 2),在云南蝠蛾中功能未知。在白马蝠蛾 中共鉴定到 114 属真菌,其中 42 属真菌未在云 南蝠蛾样本中被鉴定到,云南蝠蛾样本中也有 41 属真菌未在白马蝠蛾样本中被鉴定到。

对白马蝠蛾和云南蝠蛾样本进行组间差异 微生物群落分析,在LDA值≥4.0时,白马蝠蛾 中有 5个细菌分类单元和 12个真菌分类单元与 云南蝠蛾具有显著差异,而云南蝠蛾中有 7个细 菌分类单元和 9 个真菌分类单元与白马蝠蛾具 有显著差异,其中包含上述优势分类单元,这表 明 2种蝠蛾微生物群落存在明显的差异。在人工 饲养环境相似,饲喂食料相同的条件下,2种人 工繁育蝠蛾体内细菌和真菌群组成结构完全不 同。而昆虫肠道内微生物与寄主共生,具有协助 寄主消化、解毒和抵御外来病原菌入侵等作用, 直接影响寄主生长发育以及交配繁殖等生命活动(Engel and Moran, 2013;周帆等, 2020)。 由此推测白马蝠蛾和云南蝠蛾体内微生物群落 结构存在差异可能与其是否为冬虫夏草寄主以 及其是否被冬虫夏草菌侵染有关。

本研究对 2 组样本细菌群落进行 COG 功能 预测,白马蝠蛾样本更偏向氨基酸转运与代谢功 能,而云南蝠蛾样本更偏向翻译、线粒体的结构 与发生功能,虽然都是基础代谢或生理功能,但 偏向有所不同。值得一提的是2组样本中未知功 能细菌群落丰度较高,但目前数据库还不能对全 部微生物的功能进行全面预测。对2组样本细菌 群落进行 KEGG 功能预测, 白马蝠蛾样本中 DNA 解旋酶、ATP 结合区和 ABC 转运蛋白丰度 较高,云南蝠蛾样本中辅酶 Q 还原酶、推定转 座酶和核糖体丰度较高,均与基础代谢或生理功 能相关。白马蝠蛾样本中镉运出 ATP 酶和锌运 出 ATP 酶丰度较高, 推测白马蝠蛾样本中部分 微生物存在对某些微量元素的代谢功能,尤其是 像镉等重金属元素。而云南蝠蛾样本中细菌分泌 系统丰度较高,细菌分泌系统,与细菌生长和致 病性密切相关(于俊媛等, 2015), 推测云南蝠 蛾样本中某些有害细菌较为活跃。FUNGuild 是 一款将真菌物种分类与功能分类联系起来进行 真菌分类分析的工具 (Schmidt et al., 2019), 通 过 FUNGuild 分析得到, 白马蝠蛾样本中真菌属 于动物病原菌-土壤腐生真菌类别最多,占 46.26%, 未定义腐生真菌其次占 24.52%, 证明 白马蝠蛾样本中真菌大部分来源于动物病原菌、 土壤腐生菌及未定义腐生菌;而云南蝠蛾样本中 占比最高的真菌类别为植物病原菌(38.31%), 其次为未定义腐生真菌(28.81%),与白马蝠蛾 样本不同,云南蝠蛾样本中真菌大部分来源于植 物病原菌和未定义腐生菌。2 组真菌样本进行 KEGG 和 MetaCyc pathway 功能预测, 2 组样本 中真菌功能丰度较高的类别均与基础代谢或生 理功能相关。对比2组微生物群落预测的功能发 现,丰度较高的功能类别均与基础代谢或生理功 能相关,但存在一定差异。通过对微生物群落功

能进行预测,初步分析了白马蝠蛾样本和云南蝠 蛾样本中部分微生物群落的功能,但若想挖掘寄 主蝠蛾体内微生物群落功能与冬虫夏草侵染过 程之间的密切关系,还需对其体内重要微生物进 行分离培养和更深入研究。同时,本文在分析白 马蝠蛾和云南蝠蛾微生物群落功能的研究中发 现,还有许多未知功能的真菌有待进一步研究。

#### 参考文献 (References)

- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J, 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41): 15196–15199.
- Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J, 2018. *fastp*: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17): i884–i890.
- Dai YD, Wu CK, Wang YB, Wang Y, Huang LD, Dang XJ, Mo XX, Zeng PS, Yang ZL, Yang DR, Zhang CM, Lemetti P, Yu H, 2019.
  Phylogeographic structures of the host insects of *Ophiocordyceps* sinensis. Zoology, doi: 10.1016/j.zool.2019.03.003.
- Dai YD, Wu CK, Yuan F, Wang YB, Huang LD, Chen ZH, Zeng WB, Wang Y, Yang ZL, Zeng PS, Lemetti P, Mo XX, Yu H, 2020. Evolutionary biogeography on *Ophiocordyceps sinensis*: An indicator of molecular phylogeny to geochronological and ecological exchanges. *Geoscience Frontiers*, 11(3): 807–820.
- Dillon RJ, Charnley AK, 1995. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: In vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerons*. Journal of Invertebrate Pathology, 66(1): 72–75.
- Edgar RC, 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*, 10(10): 996–998.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Fu HB, Cong B, Dai QH, 2005. Wolbachia endosymbionts in Trichogramma and their impacts on the hosts. Chinese Journal of Biological Control, 21(2): 70–73. [付海滨, 丛斌, 戴秋慧, 2005. 赤眼蜂内生菌沃尔巴克氏体及其对宿主影响. 中国生 物防治, 21(2): 70–73.]
- Fu JF, Wang CR, Wu YS, 1994. A review on the studies of Mycocentrospora acerina (Hartig) Deighton. Journal of Shenyang Agricultural University, 25(1): 92–99. [傅俊范, 王崇 仁, 吴友三, 1994. 槭菌刺孢[Mycocentrospora acerina (Hartig) Deighton]研究历史和现状. 沈阳农业大学学报, 25(1): 92–99.]

- Guo YZ, Wei Q, Gao J, Liu BY, Zhang T, Hua HM, Hu YC, 2019. Metabolites of the psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus pannorum. Natural Product Research and Development*, 31(3): 446–449, 505. [郭永智, 魏茜, 高洁, 刘冰语, 张涛, 华会明, 胡友财, 2019. 嗜低温真菌 *Pseudogymnoascus pannorum* 次级 代谢产物研究.天然产物研究与开发, 31(3): 446–449, 505.]
- Hammes WP, Hertel C, 2006. The genera Lactobacillus and Carnobacterium. The Prokaryotes, doi: 10.1007/0-387-30744-3\_10.
- Han RC, Wu H, Tao HP, Qiu XH, Liu GQ, Rao ZC, Cao L, 2019. Research on Chinese cordyceps during the past 70 years in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 849–883. [韩日 畴, 吴华, 陶海平, 丘雪红, 刘桂清, 饶中臣, 曹莉, 2019. 中 国冬虫夏草研发 70 年. 应用昆虫学报, 56(5): 849–883.]
- Hidalgo KJ, Saito T, Silva RS, Delforno TP, Duarte ICS, Oliveira VMD, Okada DY, 2020. Microbiome taxonomic and functional profiles of two domestic sewage treatment systems. *Biodegradation*, 32(1): 17–36.
- Hurst GD, Jiggins FM, 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerging Infectious Diseases*, 6(4): 329–336.
- Li CP, Tang DX, Wang YB, Fan Q, Zhang XM, Cui XL, Yu H, 2021. Endogenous bacteria inhabiting the *Ophiocordyceps highlandensis* during fruiting body development. *BMC Microbiology*, doi: 10.1186/S12866-021-02227-W.
- Liao XB, Chen C, Zhang JX, Dai Y, Zhang XJ, Xie S, 2014. Operational performance, biomass and microbial community structure: Impacts of backwashing on drinking water biofilter. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1): 546–554.
- Lin YB, Wang Z, Huang XF, Zheng FY, 2019. Research status on biological characteritics host insects and larva feeding of *Ophiocordyceps sinensis* Berk. Sacc., *Hepithelial armoricanus* oberthlir. *Fujian Agricultural Science and Technology*, (5): 66–69. [林阳步, 王忠, 黄雪峰, 郑方毅, 2019. 冬虫夏草寄主 昆虫蝙蝠蛾生物学特性及其幼虫饲养研究现状. 福建农业科 技, (5): 66–69.]
- Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008.
  Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus* gonggaensis larae. Acta Microbiologica Sinica, 48(5): 616–622.
  [刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.]
- Magoč T, Salzberg SL, 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957–2963.

- Mu DD, Wang ZK, Duan YP, 2010. Changes of intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae after feeding with *Carnobacterium* sp. Hg4-03 as a probiotic strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 50(2): 251–255. [穆冬冬, 王中康, 殷幼 平, 2010. 饲喂肉杆菌 Hg4-03 对贡嘎蝠蛾幼虫肠菌生物多样 性的影响. 微生物学报, 50(2): 251–255.]
- Nguyen NH, Song ZW, Bates ST, Brancoc S, Tedersoo L, Menkea J, Schillinge JS, Kennedy PG, 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20(1): 241–248.
- Park T, Ma L, Ma Y, Zhou XP, Bu DP, Yu ZT, 2020. Dietary energy sources and levels shift the multi-kingdom microbiota and functions in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1): 66.
- Qiu Y, Chen YL, Peng C, Wan DG, Shen CH, Yi B, Hou FX, Guo JL, 2015. Study on host insects of Chinese *Cordyceps. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 26(3): 720–722. [邱乙, 程元柳, 彭成, 万德光, 沈才洪, 易彬, 侯飞侠, 国锦琳, 2015. 中国冬虫夏草寄主昆虫研究. 时珍国医国药, 26(3): 720–722.]
- Rogers MB, Firek B, Shi M, Yeh A, Brower-Sinning R, 2016. Disruption of the microbiota across multiple body sites in critically ill children. *Microbiome*, 4(1): 66.
- Schmidt R, Mitchell J, Scow K, 2019. Cover cropping and no-till increase diversity and symbiotroph: Saprotroph ratios of soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, doi: 10.1016/j.soilbio.2018.11.010.
- Stackebrandt E, Goebel BM, 1994. Taxonomic note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal* of Systematic Bacteriology, 44(4): 846–849.
- Sung GH, Nigel LHJ, Sung JM, Luangsa-ard J, Shrestha B, Spatafora JW, 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Study in Mycology*, doi: 10.3114/sim.2007.57.01.
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H, 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7): e40863.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy.*Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261–5267.

- Werren JH, 1997. Biology of Wolbachia. Annual Review of Entomology, 42: 587.
- Yang DR, Li CD, Shen FR, 1992. Three new species of the genus *Hepialus* from Yunnan and Xizang, China (Lepidoptera: Hepialidae). *Zoological Research*, 13(3): 245–250. [杨大荣, 李 朝达, 沈发荣, 1992. 滇藏蝠蛾属三新种记述——(鳞翅目:蝙 蝠蛾科). 动物学研究, 13(3): 245–250.]
- Yang DR, Li CD, Shen FR, Yang YX, Shu C, 1991. Studies on the reproductive behavior of *Hepialus baimaensis* Liang. *Zoological Research*, 12(4): 361–366. [杨大荣, 李朝达, 沈发荣, 杨跃雄, 舒畅, 1991. 白马蝠蛾生殖习性的研究. 动物学研究, 12(4): 361–366.]
- Yang DR, Peng YQ, Chen JY, Cao YQ, Yang P, 2009. Advances in genus *Hepialus* moth of *Cordyceps sinensis* host. 2009 Annual Conference Proceedings of Yunnan Entomological Society. Kunming. 1–11. [杨大荣,彭艳琼,陈吉岳,曹永强,杨培, 2009. 中国冬虫夏草寄主——蝠蛾属昆虫研究进展. 云南省 昆虫学会 2009 年年会论文集. 昆明. 1–11.]
- Yu JY, Jiang B, Zhang XP, Li S, Hu XM, 2015. Bacterial type W secretion system. *Journal of Microbes and Infections*, 10(2): 127–132. [于俊媛, 姜北, 张骁鹏, 黎庶, 胡晓梅, 2015. 细菌 W型分泌系统的研究进展. 微生物与感染, 10(2): 127–132.]
- Zhang DL, Lu ZH, Liu F, Chen SJ, He ZY, 2017. Effects of different food plants on growth and nutrition of *Hepialus xiaojinensis* larvae. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 30(7): 1647–1651. [张德利, 鲁增辉, 刘飞, 陈仕江, 贺宗毅, 2017. 不同食料植物对小金蝙蝠蛾幼虫生长发育及营养成份的影响. 西南农业学报, 30(7): 1647–1651.]
- Zhang YJ, Huo LQ, Zhang S, Liu XZ, 2016. The complete mitochondrial genome of the cold-adapted fungus *Pseudogymnoascus pannorum* syn. *Geomyces pannorum*. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(4): 2566–2567.
- Zhao JW, 2014. Isolation, identification, fermentation and adenosine of *Cordyceps* was determination in *Ophiocordyceps sinensis*. Master dissertation. Xi'an: Shan Xi Normal University. [赵静雯, 2014. 冬虫夏草菌的分离、鉴定、发酵及虫草腺苷的测定. 硕 士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- 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. [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.]