

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*

孙 涛^{1,2**} 汤德相^{1,2} 代永东¹ 赵志远¹ 张灿明³ 虞 泓^{1***}

(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)

摘 要 【目的】研究并比较冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sung et al. 寄主白马蝠蛾 *Hepialus 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感染蝠蛾的影响。【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™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、冬虫夏草感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^{1,2**} TANG De-Xiang^{1,2} DAI Yong-Dong¹ ZHAO Zhi-Yuan¹
ZHANG Can-Ming³ YU Hong^{1***}

(1. Yunnan Herbal Laboratory, School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, China;

2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China; 3. 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.*

*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)

**第一作者 First author, E-mail: lrsuntao@163.com

***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™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（韩日畴等，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感染蝠蛾产生的影响,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感染机制。

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感染龄期。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: 3 260 m; 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 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μL , $2\times$ 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 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

1.4 Ion S5™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™-ST 定量系统 (Promega, 美国) 进行定量和文库质量检测。按照 Ion S5™XL 测序仪 (Thermo Scientific, 美国) 要求进行上机测序。

1.5 Ion S5™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™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/rdp-classifier/>) 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) $\geq 99.74\%$, 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™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, 而酸杆菌门 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)。

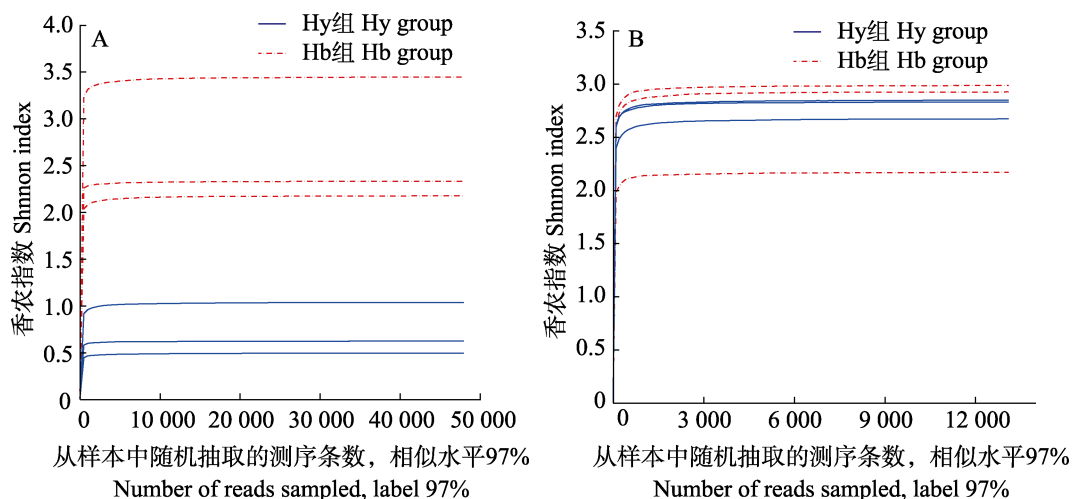


图 1 Hb 组和 Hy 组细菌和真菌香农稀释曲线

Fig. 1 Shannon curve bacteria and fungi in Hb and Hy

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.

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

微生物 Microorganisms	样本 Samples	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	覆盖率 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

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%) 和豕村菌属 *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 组中鉴定到脱醯菌种属 *Demequina*、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™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

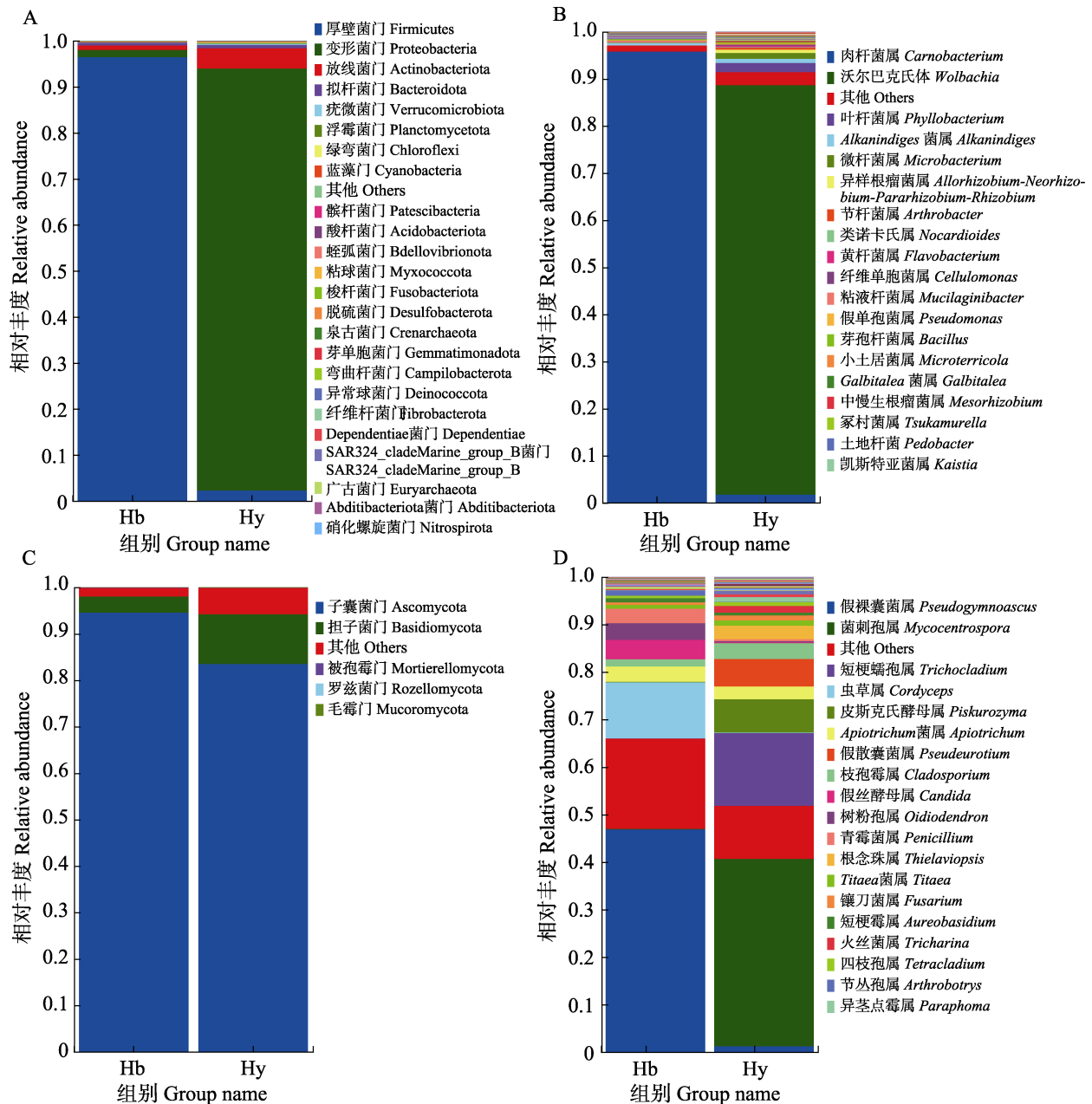


图 2 Hb 组和 Hy 组微生物群落组成

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 *Mycoglossospora* 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 *Cephalophora* 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 ≥ 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 *Leptobacillum*) 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

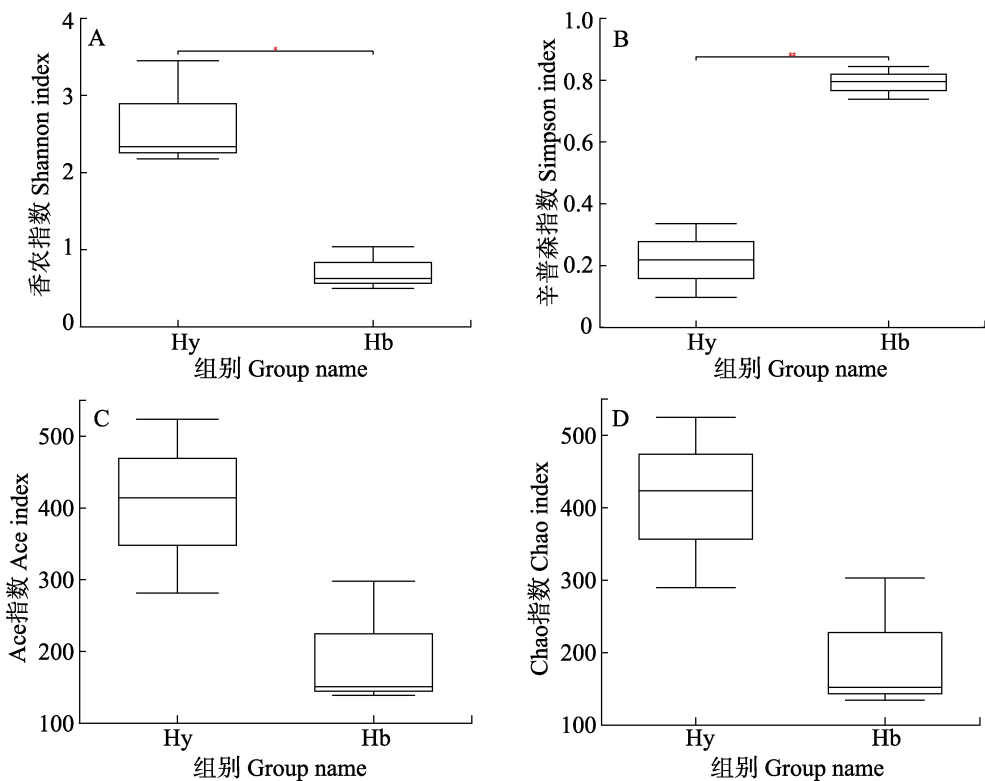


图 3 Hb 组和 Hy 组细菌 Alpha 多样性指数箱图
Fig. 3 The boxplots of Alpha diversity of bacteria in Hb and Hy

- 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.

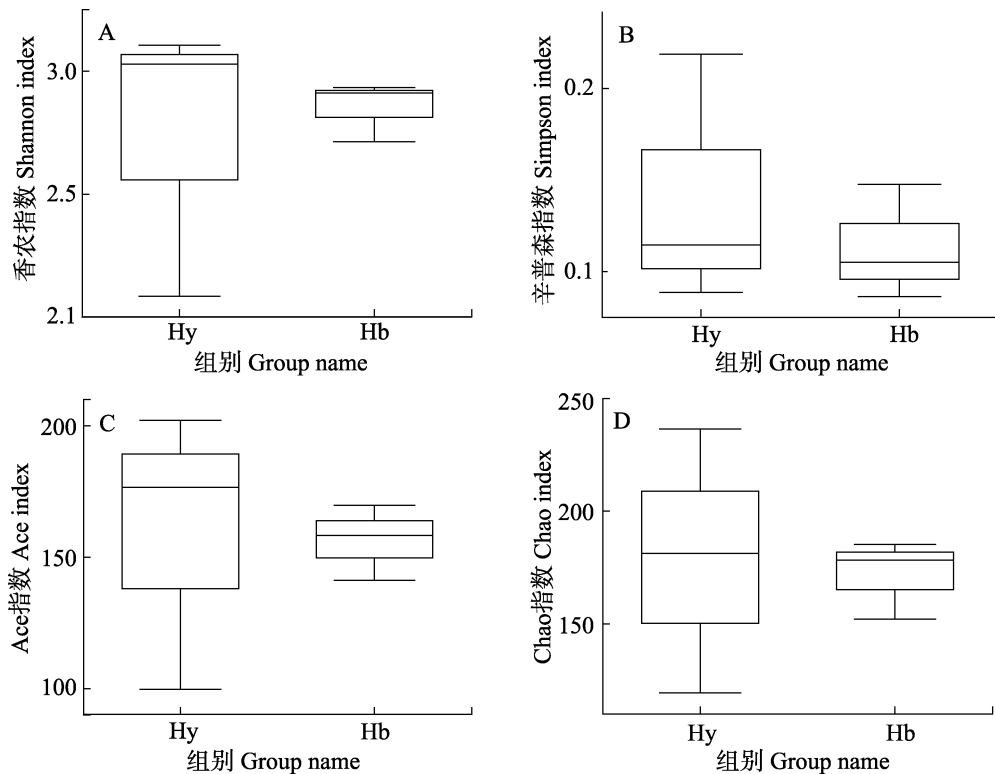


图 4 Hb 组和 Hy 组真菌 Alpha 多样性指数箱图

Fig. 4 The boxplots of Alpha diversity of fungi 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.

Leptobacillum 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

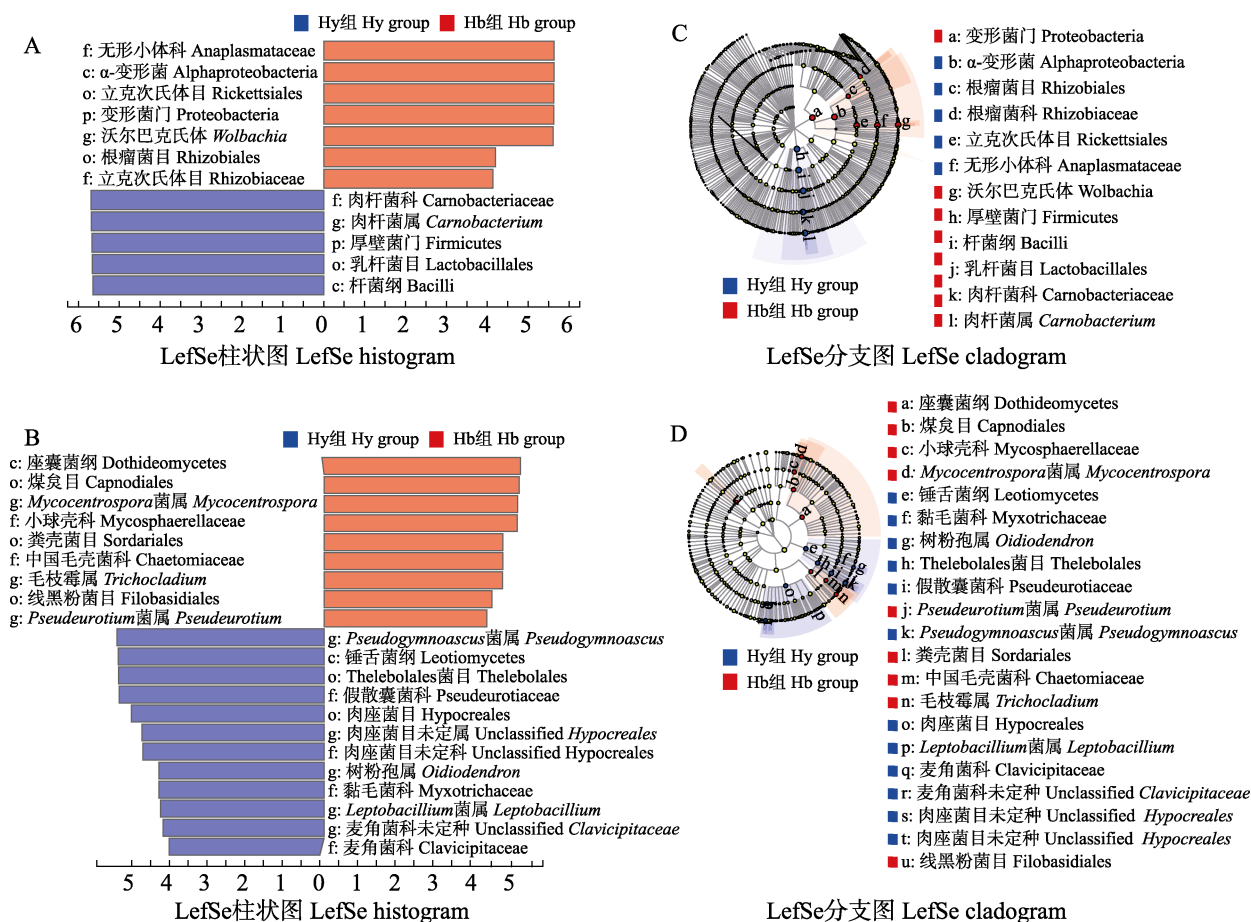


图 5 Hb 组和 Hy 组微生物群落 LefSe 分析

Fig. 5 LefSe analysis of microorganism communities between the Hb and Hy

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

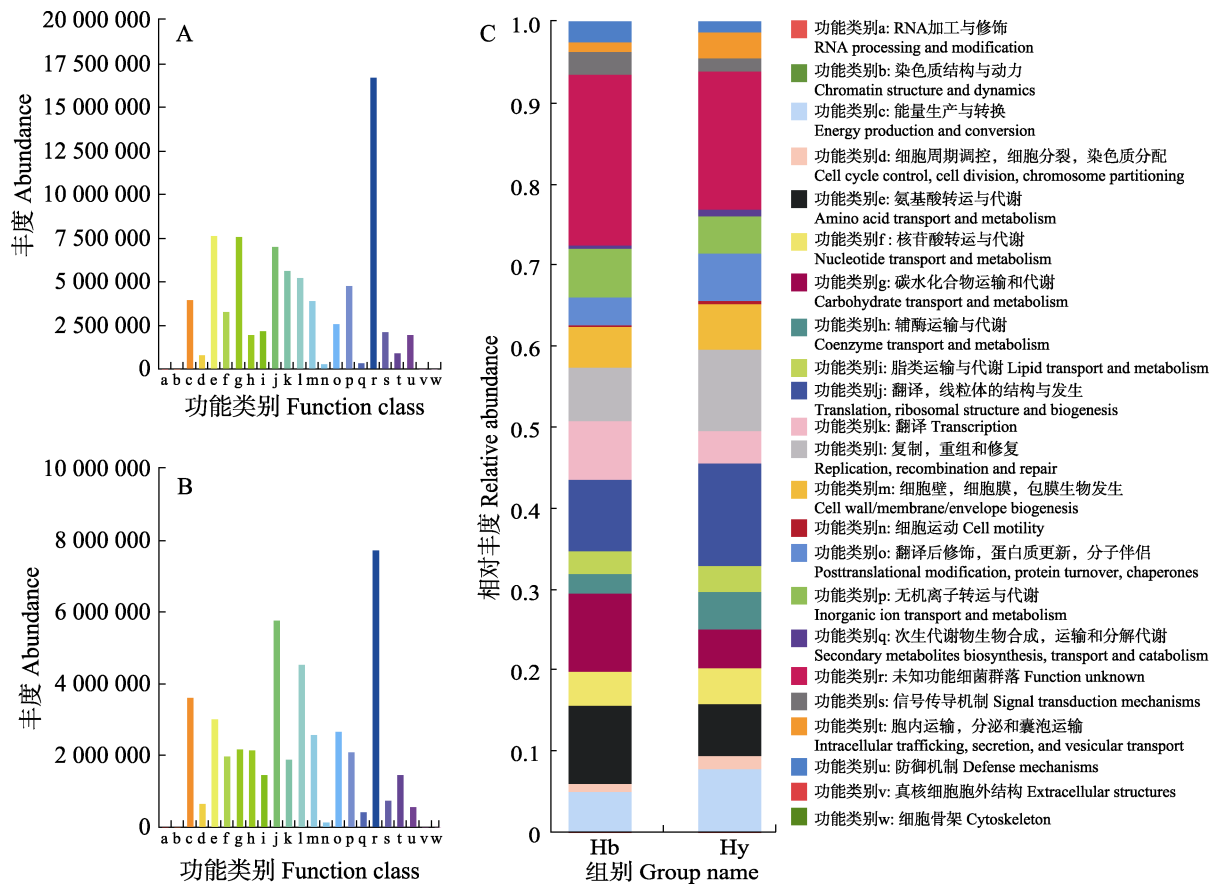


图6 Hb组和Hy组细菌群落COG功能丰度图

Fig. 6 Abundance comparison chart of COG function of bacterial communities in the Hb and Hy

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;

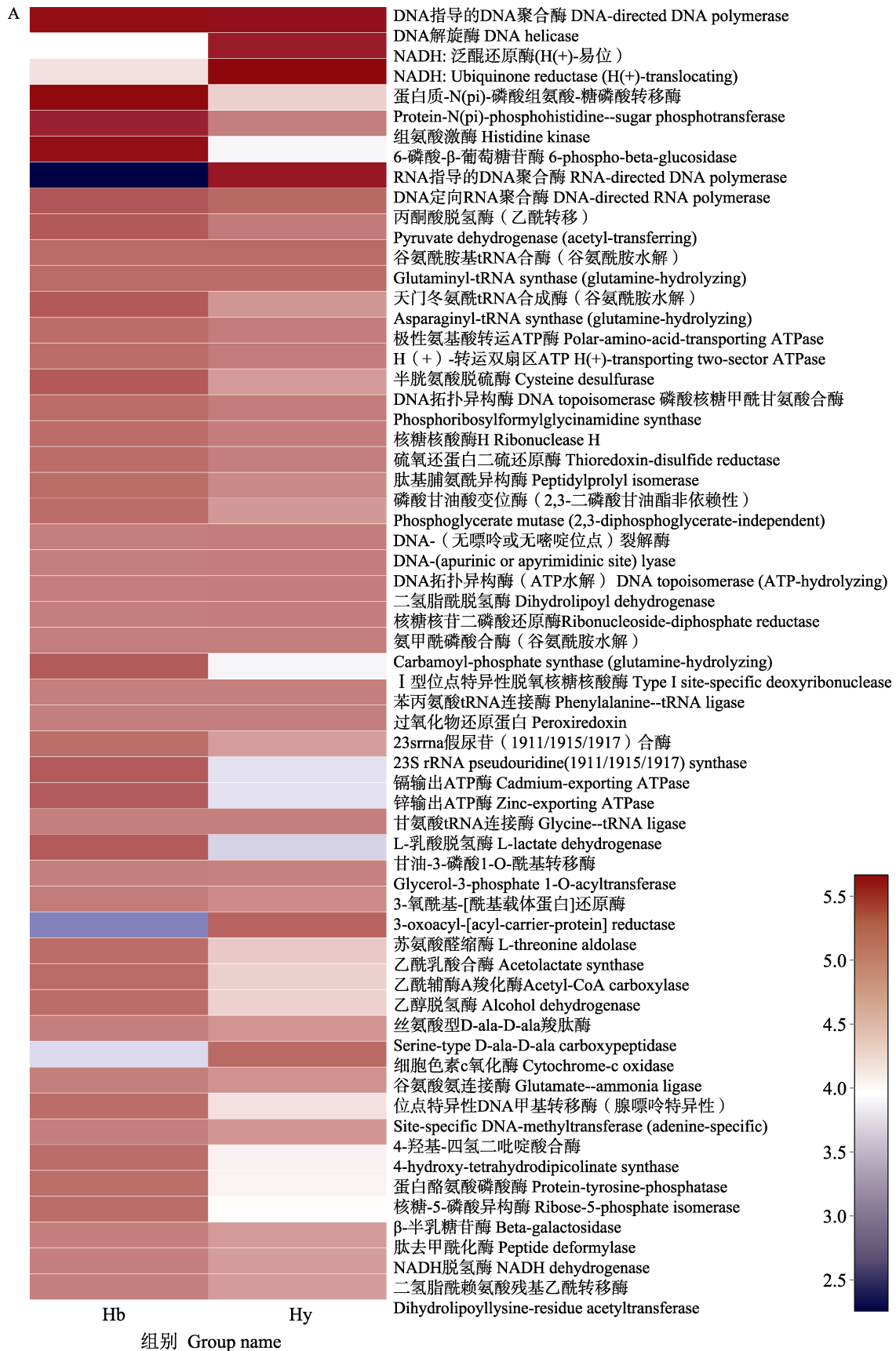
C. Abundance comparison chart of COG function of bacterial communities in the Hb and Hy.

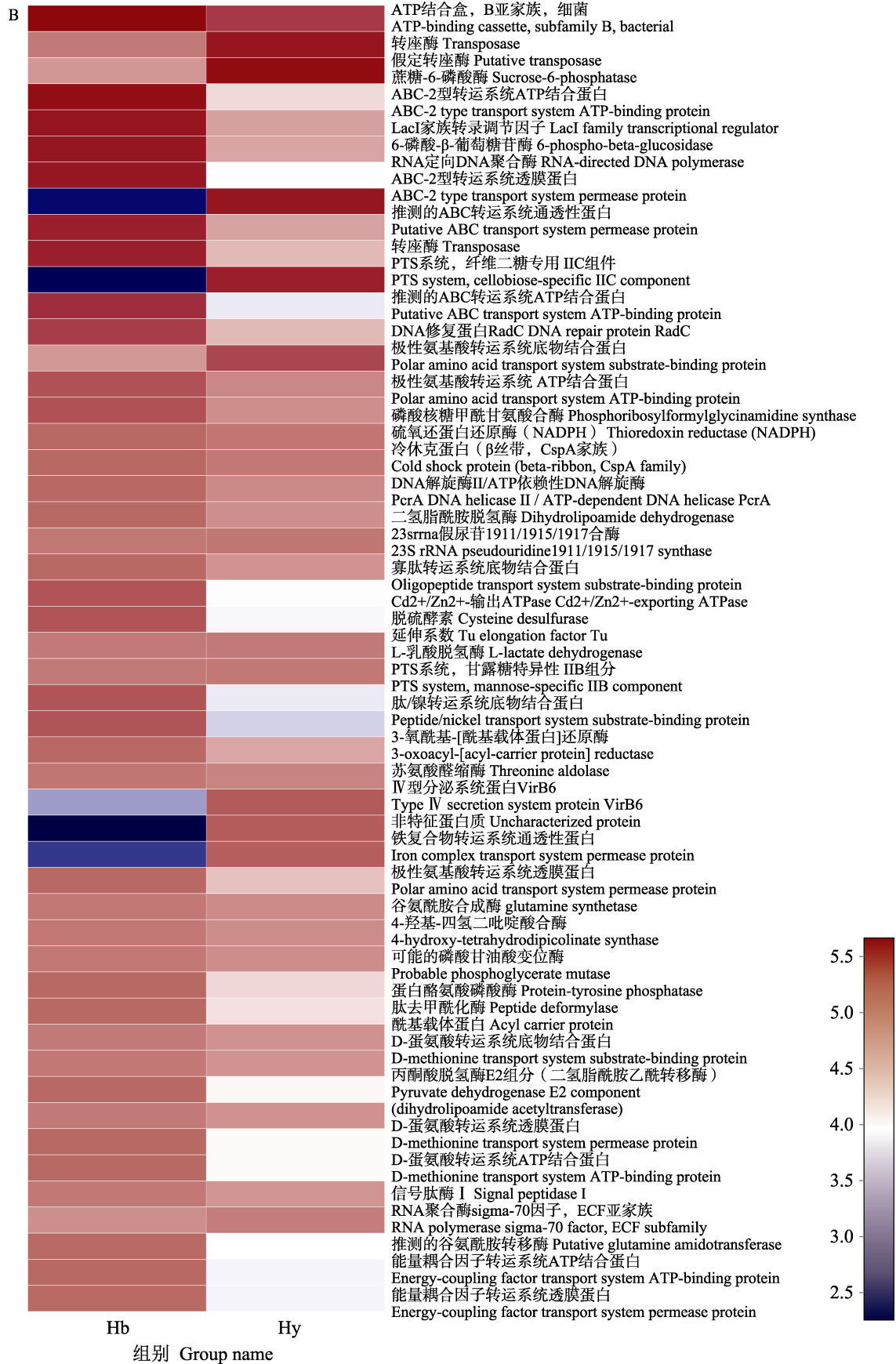
和代谢通路上均存在较大差异。

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 (PWY-3781)、有氧呼吸第 II 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。





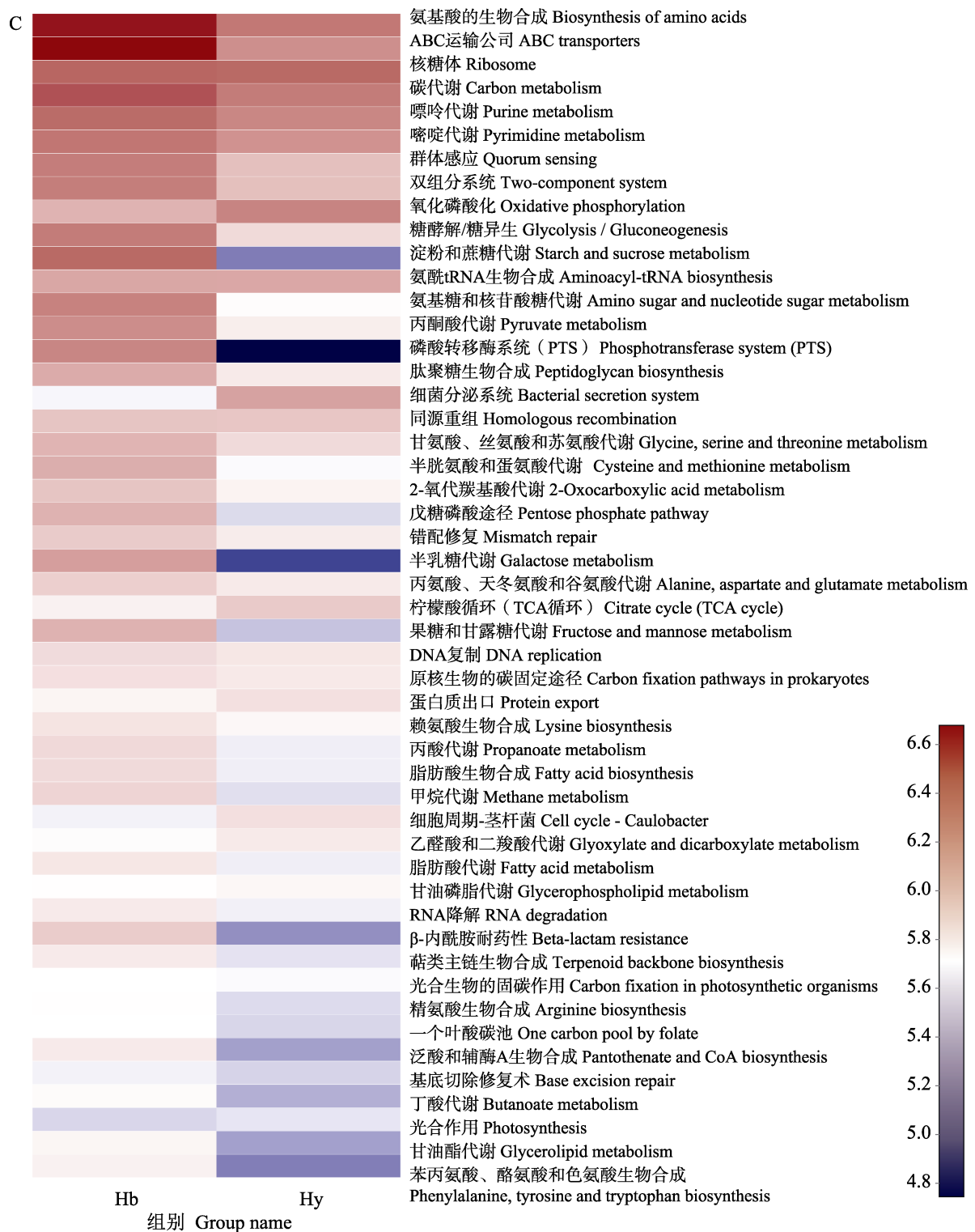


图 7 Hb 组和 Hy 组细菌群落 KEGG 功能丰度热图

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.

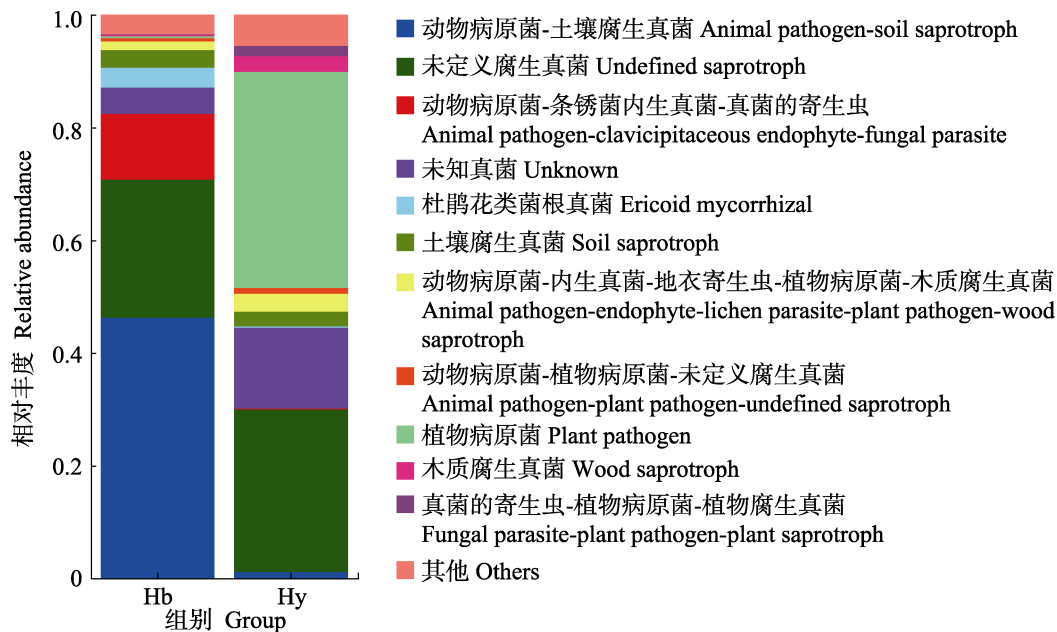


图 8 Hb 组和 Hy 组真菌群落 FUNGuild 功能相对丰度柱状图

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

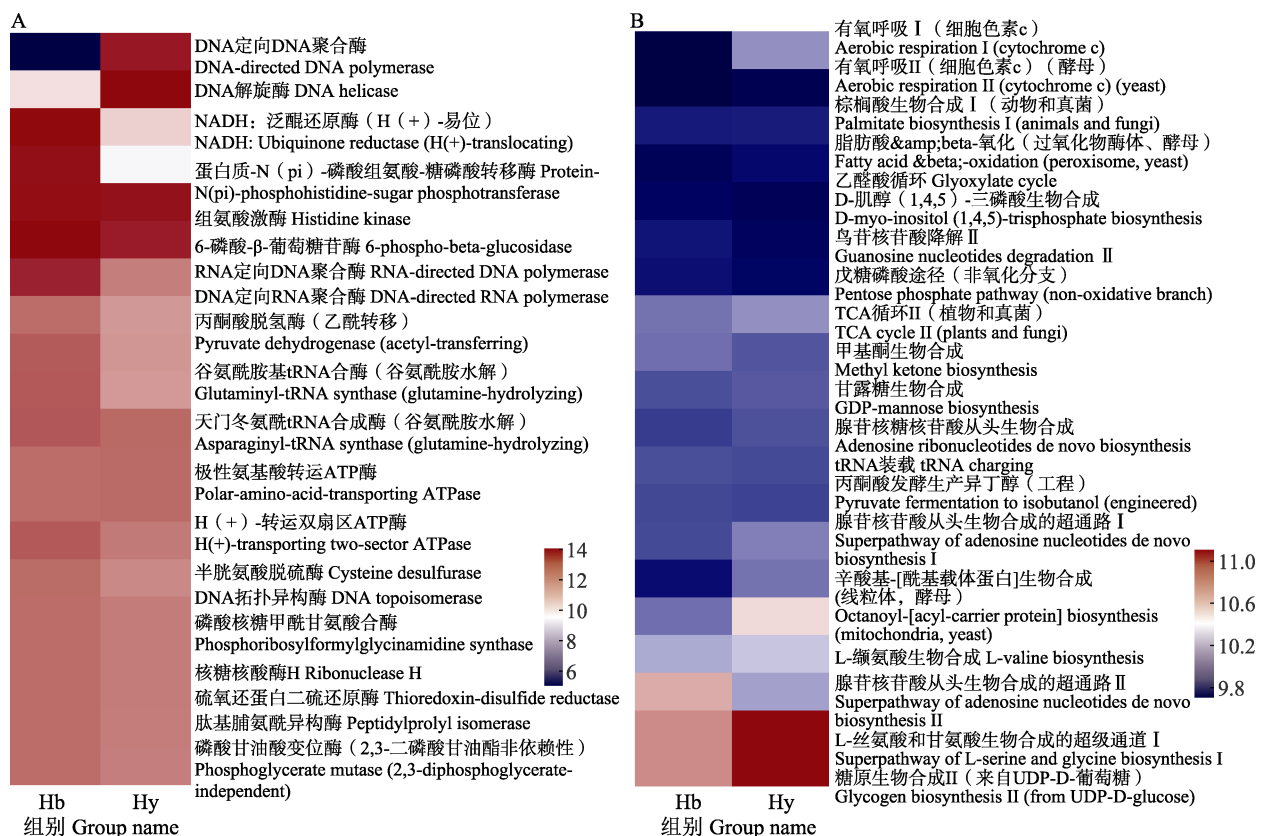


图 9 Hb 组和 Hy 组真菌群落功能丰度排名前 20 热图

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™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)。

表 2 白马蝠蛾与云南蝠蛾优势菌属信息表

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 <i>Hepialus baimaensis</i>	肉杆菌属 <i>Carnobacterium</i>	95.55	肉、鱼、家禽以及胃肠道菌群, 某些物种具有湖泊等	抑制有害病菌功能	Hammes and Hertel, 2006
	假裸囊菌属 <i>Pseudogymnoascus</i>	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	Zhang <i>et al.</i> , 2016; 郭永智等, 2019
云南蝠蛾 <i>Hepialus yunnanensis</i>	沃尔巴克氏体 <i>Wolbachia</i>	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
	菌刺孢属 <i>Mycocentrospora</i>	37.87	蔬菜、花卉及胞囊线虫	导致蔬菜和观赏植物病害等多种病害	傅俊范等, 1994

由此可见,沃尔巴克氏体很可能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 agglomerans*. *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. 槲菌刺孢 [*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 characteristics 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* larvae. *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, Schilling 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 VII 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 VII 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分的影响. *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.]