

冬虫夏草菌对小金蝠蛾肠道菌群多样性的影响*

卫秋阳** 邓小书 贺元川 邢康康 陈仕江***

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要 【目的】为探究冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 侵染小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 幼虫后肠道微生物菌群落演变规律, 对优势菌群功能进行预测与评价, 明确肠道微生物在冬虫夏草的形成过程中的营养供给机制。【方法】选取健康未感菌的小金蝠蛾卵、1 龄幼虫、5 龄幼虫、蛹、成虫及感菌 5 龄幼虫的肠道组织进行 16S rDNA 检测, 评价肠道内容物中的菌群功能及多样性差异。【结果】在肠道组织内, 菌群丰度随着龄期的增长逐渐降低, 由 1 龄期的 1 391 种降低至蛹期的 305 种, 肠道内的菌群以变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌群, 只有少数为厚壁菌门 (Firmicutes)。但是, 在 5 龄幼虫感菌僵化的关键期, 肠道菌群生物丰富度、多样性和均匀度均有所降低。尤其是香浓指数 (Shannon)、辛普森多样性指数 (Simpson) 及均匀度指数 (Pielou's evenness) 与对照组存在显著差异 ($P=0.05$), 此时的优势菌群也更替为厚壁菌门, 尤其是乳酸菌属 (*Lactococcus*)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*) 丰度显著上升。对比真菌侵染前后微生物代谢通路差异, 发现视黄醇代谢、磷酸肌醇代谢、果糖和甘露糖代谢等消化相关通路均显著上调 ($P<0.001$), 尤其是糖代谢途径中的丙酮酸发酵途径、磷酸戊糖途径、糖酵解途径分别上调 8.44 倍、4.19 倍和 2.90 倍。通过对宿主消化能力进行验证, 证实肠道消化功能显著提升, 胰蛋白酶、蔗糖酶、脂肪酶活力分别提升 (13 993±665.00)、(0.52±0.06)、(0.04±0.01) U/mL, 尤其是淀粉酶活力相较于对照组差异极显著 ($P<0.001$), 活力提升 (0.68±0.01) U/mL。【结论】冬虫夏草菌侵染宿主小金蝠蛾后, 其肠道优势菌群更替为厚壁菌门, 并参与多糖类代谢途径, 提升肠道消化酶活力, 促进宿主对营养物质的吸收利用。

关键词 群落结构; 冬虫夏草; 变形菌门; 厚壁菌门; 营养代谢

Influence of *Ophiocordyceps sinensis* infection on the composition and diversity of the gut bacterial community of *Thitarodes xiaojinensis*

WEI Qiu-Yang** DENG Xiao-Shu HE Yuan-Chuan XING Kang-Kang CHEN Shi-Jiang***

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract 【Objectives】To investigate adaptative changes in the intestinal microbial community of *Thitarodes xiaojinensis* larvae following infection by *Ophiocordyceps sinensis* with the goal of predicting dominant microorganisms in infected individuals based on their function, and explain the nutrient supply mechanism underlying the increased abundance of certain microorganisms in cultivated *Cordyceps sinensis*. 【Methods】Healthy eggs and intestinal tissues from 1st and 5th instar larvae, pupae and adults, were selected for use as controls and intestinal tissues from mature 5th instar larvae infected with *Ophiocordyceps sinensis* were collected for analyses. 16S rDNA sequencing was used to evaluate differences in microbial community structure and diversity between infected and non-infected intestinal contents. 【Results】In healthy intestinal tissues, bacterial abundance gradually decreased with age, from 1 391 species in first instar larvae, to 305 species in pupae. In healthy tissues, Proteobacteria were the dominant flora with only a few Firmicute species present. However, in infected larvae, the biological richness, diversity, and evenness of intestinal microorganisms decreased. The Shannon index, Simpson diversity

*资助项目 Supported projects: 重庆市基本科研业务费 (cstc2020jxjl-jbky00002); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2017shmsA130117)

**第一作者 First author, E-mail: wqycsic@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: shijiangchen@163.com

收稿日期 Received: 2021-06-15; 接受日期 Accepted: 2021-10-12

index, and Pielou's evenness index of infected larvae were significantly different to those of the control group ($P=0.05$), and the Firmicutes were the dominant intestinal flora. Increases in *Lactobacillus* and *Carnobacterium* species were significant and pronounced. Analyses of microbial metabolic pathways after fungal infection revealed that energy metabolism pathways (retinol, inositol phosphate, fructose and mannose) were significantly up-regulated ($P<0.001$). Pyruvate fermentation, pentose phosphate, and glycolysis pathways were also up-regulated by 8.44-fold, 4.19-fold and 2.90-fold, respectively. Host digestive capacity was verified, confirming that intestinal digestive function was significantly improved. Trypsin, sucrase, and lipase increased by $(13\ 993\pm665.00)$, (0.52 ± 0.06) and (0.04 ± 0.01) U/mL, respectively. The increase in amylase was especially significant; enzyme activity increased by (0.68 ± 0.01) U/mL ($P<0.001$). **[Conclusion]** *O. sinensis* infection changes the dominant intestinal flora of *T. xiaojinensis* from Proteobacteria to Firmicutes. Firmicutes participate in polysaccharide degradation, promoting nutrient absorption and utilization by the host.

Key words community structure; *Cordyceps sinensis*; Proteobacteria; Firmicutes; nutrient metabolism

冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 是青藏高原所特有的一种虫生真菌,能够寄生于蝠蛾属 *Hepialus* 昆虫,形成虫菌复合体并最终形成冬虫夏草(刘飞等, 2006)。冬虫夏草作为我国传统名贵中药材,具有补肾益肺,止血化痰等功效,经现代药理研究证实,具有免疫调节、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗衰老、护肝等作用(张青等, 2015)。良好的药用价值催生市场对野生虫草资源的迫切需求,但是,冬虫夏草生长环境苛刻,加之过度挖掘、资源破坏、气候变化等原因,造成野生冬虫夏草产量急剧下降,而寄生于蝠蛾体内的真菌繁殖缓慢,延长了冬虫夏草的生长周期,更加剧了市场的供需失衡。

在冬虫夏草菌侵染寄主后,菌丝体会逐步扩散至整个虫体,形成一种较为稳定的共存关系,这些真菌的定殖、生长均来自于宿主体内的养分供给(Zhang *et al.*, 2008)。这些外源微生物对能量的诉求均来自于昆虫体内的多糖,而糖类本身也是构成生命体的四大基本物质之一,更是微生物重要的营养来源,具有广泛的生物学效应(Chen *et al.*, 2017)。已有研究指出,冬虫夏草菌对糖类物质具有较高需求,在外源添加葡萄糖、麦芽糖、甘露醇和可溶性淀粉时,冬虫夏草菌芽生孢子产量、菌丝干重均显著增加(Ying *et al.*, 2020)。然而,像冬虫夏草菌这种掠夺式营养竞争势必会打破宿主体内固有的能量循环,造成昆虫体内微生物产生营养性竞争,破坏寄主体内原有的共存关系,加速虫体内微生物群落的演变(Engel and Moran, 2013; Luckhart and

Riehle, 2020)。

肠道内壁是微生物的绝佳栖息地,容纳了生物体内 90%以上的微生物,囊括绝大多数的细菌、古细菌、酵母菌和原生动物(Chen *et al.*, 2017)。冬虫夏草菌对虫体内有限资源的竞争将直接导致肠道微生物群落紊乱,而肠道作为昆虫重要的消化吸收器官,不仅满足寄主自身的营养需求,还为微生物提供维持稳态所必需的底物(Xiao *et al.*, 2021)。作为回报,这些肠道菌群可以极大地促进宿主消化,分泌多种降解酶或诱导糖类发酵,将多糖降解为单糖、二糖,促进宿主对糖类的吸收(Xiao *et al.*, 2021),甚至能够代谢产生短链脂肪酸(SCFA),积极参与调节宿主的多项生物进程,并为后续生理调控提供关键识别信号(Engel and Moran, 2013; Jing *et al.*, 2018)。

在冬虫夏草形成过程中,大多是以宿主体内营养物质为媒介,将外源冬虫夏草菌与宿主肠道微生物有机关联,共同构成一个复杂的虫菌复合体(Yan *et al.*, 2014)。虽然,已有研究证实,肠道菌群是维持生物体生理功能的重要器官(Shayla *et al.*, 2018)。但是,在冬虫夏草形成过程中,虫菌复合期漫长,外源真菌与肠道菌群之间存在协同进化关系。截至今,人们对虫草宿主肠道菌群的规律性变化仍知之甚少,更对冬虫夏草菌侵染前后,肠道菌群差异以及菌群更替后所承担的生物功能知之甚少。为此,本研究采用 16S rDNA 微生物扩增技术对蝠蛾幼虫肠道内微生物进行测序,构建健康宿主的肠道群落结构以及受到冬虫夏草菌侵染后肠道菌群更替规律,

依据微生物功能注释, 阐明肠道内生菌群在宿主营养吸收、抵抗病原体中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本试验所采用的蝠蛾种类均为小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis*, 供试虫源由重庆市中药研究院冬虫夏草研究所人工培植基地提供(四川省康定市雅家梗村), 培养期间土壤温度为(8 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 土壤湿度为 $50\%\pm 5\%$, 无光照。

1.2 感菌处理

挑取适龄幼虫于独立饲养小室内($10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 2\text{ cm}$), 饥饿处理 48 h, 随后加入经冬虫夏草菌拌基质处理的珠芽蓼, 任其取食。待小金蝠蛾幼虫培育至 5 龄期, 收取幼虫镜检, 在幼虫组织液内检出冬虫夏草菌虫菌体即为感菌幼虫, 反之则为未感菌幼虫。

1.3 肠道组织提取

卵处理方式: 收集成虫交尾后 48 h 内产下的卵块, 先用 PBS 缓冲液清洗卵表面, 随后置于 75% 酒精震荡消毒 5 min, 将消毒后的虫卵再次置于 PBS 缓冲液中除去残存酒精, 晾干后置于 -80°C 短期保存。

幼虫、蛹、成虫的肠道组织提取方式: 分别选取长势良好的 1 龄、5 龄幼虫、蛹及成虫, 置于 PBS 缓冲液中彻底清洗虫体泥土并利用 75% 酒精再次震荡清洗幼虫体表; 经过消毒的幼虫再次置于 PBS 缓冲液, 除去体表残余的酒精。随后使用手术剪去昆虫肛门, 沿着切口从昆虫体侧划开表皮, 使用尖头镊子小心剥离肠道组织, 确保肠道内容物无破损外流, 最后对完整的肠道外壁再次消毒并置于 -80°C 短期保存。

1.4 小金蝠蛾肠道菌群 16S rDNA 测序分析

肠道菌群测序样本分为各龄健康且未感菌昆虫以及感菌的 5 龄幼虫。由于小金蝠蛾为土栖昆虫, 幼虫的发育与蜕皮极难观测, 故只选取卵, 低龄幼虫(1 龄)、高龄幼虫(5 龄)、蛹和成虫肠

道组织; 虫草菌感菌处理后, 仅选取虫草僵化关键期的 5 龄幼虫肠道组织, 每组取 3 份样品, 用干冰寄送至南京派森诺基因科技有限公司测序, 依据测序结果, 统计肠道菌群数量以及物种组成。

1.5 肠道优势微生物代谢通路注释与功能评价

基于菌群的多样性及物种组成数据, 运用 PICRUST2 (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 标记基因序列丰度, 构建遗传进化树并推断它们的共同祖先的基因功能谱。依据微生物功能, 选取感菌 5 龄幼虫与未感菌的 5 龄幼虫, 分别测定其肠道主要消化酶活力, 该项测试采用江苏酶免实业有限公司生产的酶联免疫(ELISA)试剂盒进行, 测定酶活种类包括胰蛋白酶、淀粉酶、蔗糖酶、脂肪酶, 检测方法参照说明书进行。酶活检测结果包含生物学重复 3 次, 技术重复 2 次。

1.6 数据分析

数据使用平均值 $\pm$ 标准误表示, 所有试验数据利用 SPSS 软件进行比较分析, 组间差异性均采用 *t*-test 检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 小金蝠蛾肠道菌群多样性分析

测序发现小金蝠蛾肠道微生物种类随龄期变化明显, 1 龄幼虫的肠道微生物丰富度最高, 达到 1 391 种, 然而, 菌群数量会随着蝠蛾龄期的增长不断降低, 直至蛹期, 检测获得的肠道微生物丰富度最低, 仅有 305 种(图 1: A)。按照微生物分类阶元进行统计分析, 发现 1 龄幼虫处于旺长期, 肠道微生物种类丰富多样, 分属 14 门、93 属, 而发育至蛹期, 昆虫往往不食不动, 其肠道内菌群丰度下降, 仅含有 10 门、39 属的微生物。此外, 成虫肠道微生物分类与卵期昆虫胚胎内的微生物高度同源, 大多分属于相同的 10 个门类(图 1: B)。纵观蝠蛾世代周期, 仅有 47 种核心肠道微生物能够长期定殖, 且大多属于变形菌门(Proteobacteria)(革兰氏阴性菌), 只有少数种类属于厚壁菌门(Firmicutes)(图 2:

A)。就微生物群落遗传关系来看, 将优势微生物分为三支, 以不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、链球菌 (*Streptococcus*) 为主的致炎微生物归为一支, 而将单胞菌

(*Cellulomonas*)、肉食杆菌 (*Carnobacterium*)、根瘤菌 (*Rhizobium*) 等环境微生物划为另一支, 其余则将拟杆菌、放线菌、疣微菌等划为一类(图 2: B)。

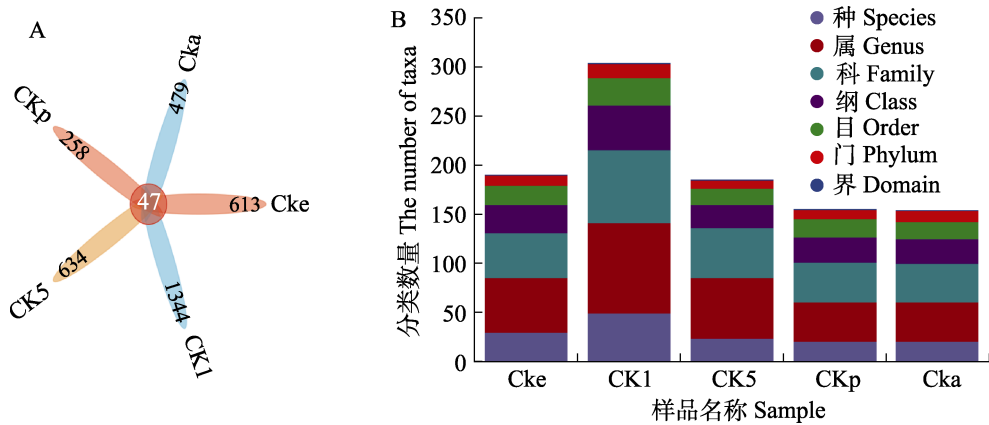


图 1 小金蝠蛾肠道菌群多样性分析

Fig. 1 Diversity analysis of *Thitarodes xiaojinensis* intestinal flora

A. 小金蝠蛾肠道菌数量分析; B. 小金蝠蛾肠道微生物分类单元统计。

A. Analysis of the quantity of intestinal flora; B. Statistics of *Thitarodes xiaojinensis* intestinal microbes classification unit. Cke: 正常虫卵; CK1: 正常 1 龄幼虫; CK5: 未感菌 5 龄幼虫; CKp: 正常的蛹; Cka: 正常的成虫。下同。

Cke: Normal eggs; CK1: Normal 1st instar larvae; CK5: Uninfected 5th instar larvae;

CKp: Normal pupae; Cka: Normal adults. The same below.

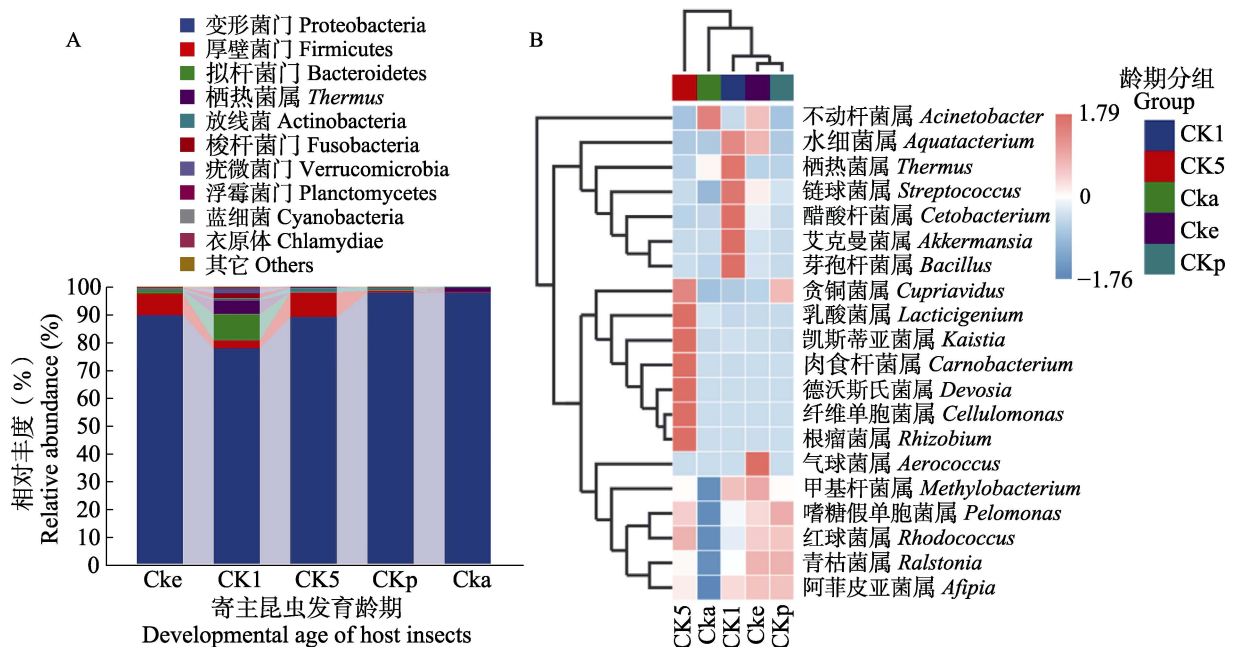


图 2 小金蝠蛾肠道优势菌群结构

Fig. 2 The structure of the dominant intestinal flora in *Thitarodes xiaojinensis*

A. 不同龄期下蝠蛾肠道菌群演变规律; B. 不同龄期下蝠蛾肠道菌群组成热图。

A. The evolution analysis of the intestinal flora in *Thitarodes xiaojinensis* at different ages;

B. The heat map of the composition of the intestinal flora in *Thitarodes xiaojinensis* at different ages.

2.2 冬虫夏草菌侵染对小金蝠蛾肠道菌群结构的影响

冬虫夏草菌侵染对小金蝠蛾肠道微生物群落结构影响巨大,相比于未感菌的 5 龄幼虫,肠道菌群数由 717 种锐减至 426 种,期中仅有 109 种微生物属于二者共有的菌群(图 3:A)。对具体微生物群落分类阶元进行统计,肠道微生物也由正常的变形菌门(Proteobacteria)更替为厚壁菌门(Firmicutes),原先的变形菌门则降为肠道第二大类群(图 3:B)。进一步对优势微生物进行聚类分析,结果显示在健康幼虫肠道内以假单胞菌属 *Pelomonas* 为主要优势菌,而在受到外源真菌侵染后,乳酸菌属 *Lacticigenium*、肉食杆菌

属 *Carnobacterium* 表达丰度开始逐步上升,成为肠道内新的优势菌属(图 3:C)。除此之外,通过组间单因素非参数方差分析,发现受虫草菌侵染后,5 龄幼虫肠道微生物丰富度、多样性和均匀度均有所降低(图 3:D)。尤其是香浓指数(Shannon)、辛普森多样性指数(Simpson)及均匀度指数(Pielou's evenness)均与未感菌幼虫之间存在显著差异($P=0.05$)。

2.3 肠道菌群功能与评价

受到冬虫夏草菌侵染后,更替后的优势肠道菌群功能仍然与营养吸收、生物合成、物质同化、前体代谢以及能量物质的产生紧密相关(图 4:A)。对比真菌侵染前后微生物通路功能差异,

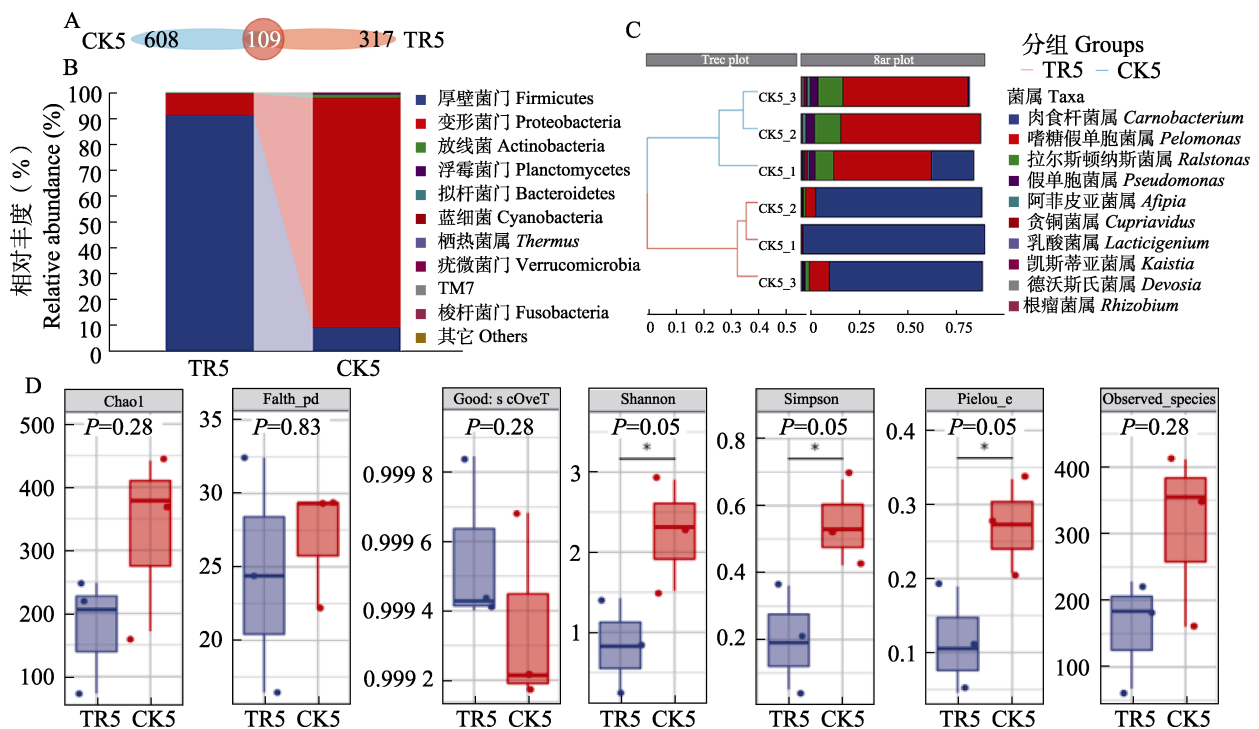


图 3 冬虫夏草菌侵染后对肠道菌群结构差异的影响

Fig. 3 The influence of *Ophiocordyceps sinensis* infection on intestinal flora structure

A. 肠道菌群数量分析; B. 肠道菌群更替分析; C. 肠道微生物层次聚类分析; D. 肠道菌群差异分析。

A. Intestinal flora quantity analysis; B. Intestinal flora replacement analysis;

C. Intestinal flora difference analysis; D. Difference analysis of intestinal flora.

TR5: 感菌的 5 龄幼虫; CK5: 未感菌的 5 龄幼虫。图 D 中以 Chao1 指数和 Observed species 指数表征丰富度,以香浓指数(Shannon)和辛普森多样性指数(Simpson)指数表征多样性,以系统发育多样性(Faith's PD)指数表征基于进化的多样性,以 Pielou's evenness 指数表征均匀度,以 Good's coverage 指数表征覆盖度。

TR5: The 5th instar larvae susceptible to bacteria; CK5: The 5th instar larvae not susceptible to bacteria; Fig. D: The richness is represented by Chao1 and observed species indices, the diversity is represented by Shannon and Simpson, the evolution-based diversity is represented by faith's PD, the evenness is represented by Pielou's evenness, and the coverage is represented by good's coverage.

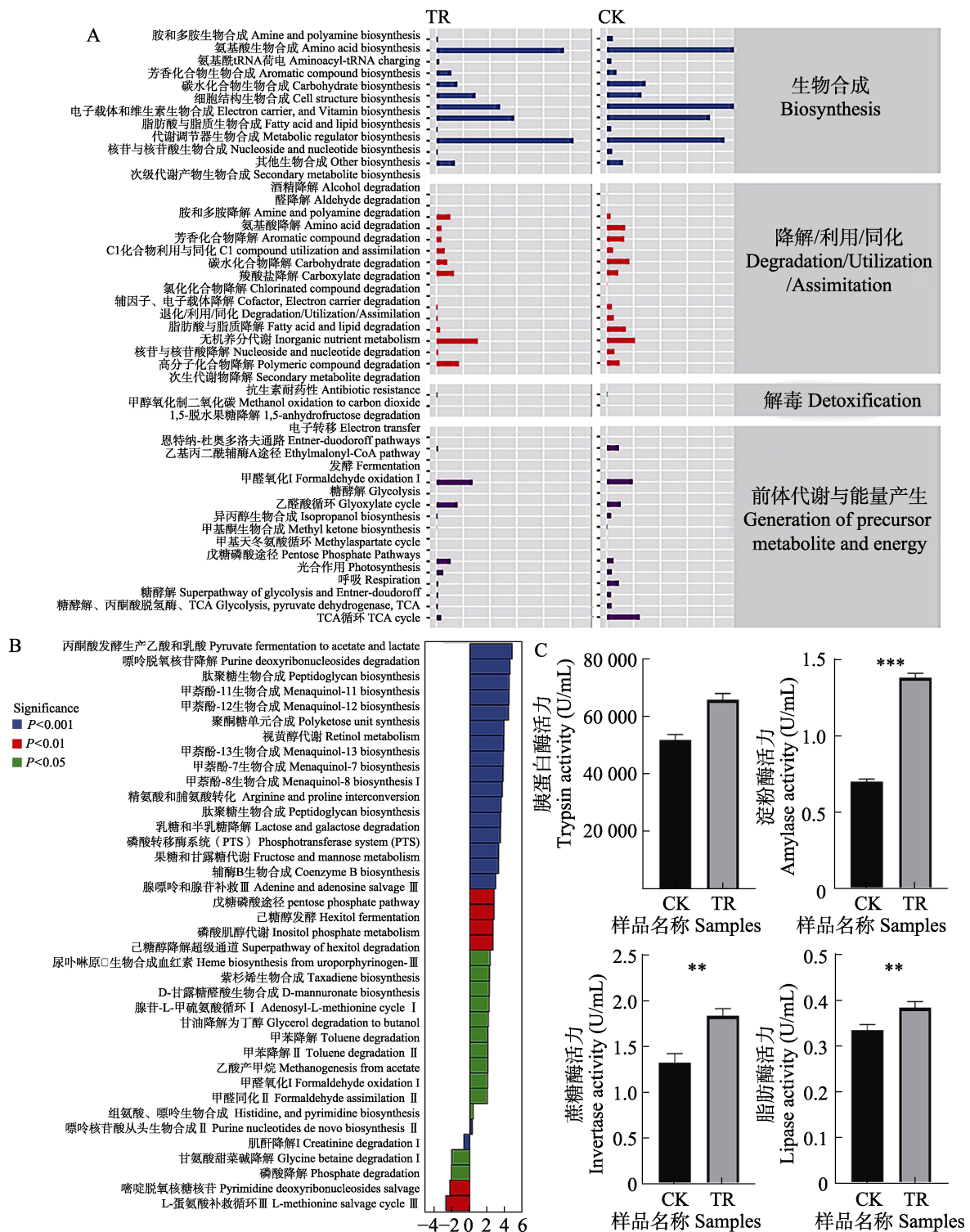


图 4 肠道菌群代谢通路与消化功能分析

Fig. 4 Annotation and analysis of intestinal flora metabolism pathway

A. 微生物代谢通路统计; B. 通路表达差异分析; C. 肠道消化酶活力评价。TR: 5 龄感菌虫;

CK: 5 龄未感菌虫。**表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

A. Microbial metabolism pathway statistics; B. Pathway expression difference analysis; C. Evaluation of intestinal digestive enzyme activity. TR: Susceptible insects (5th instar); CK: Non-susceptible insects (5th instar).

** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$.

聚酮糖单元合成、视黄醇代谢、磷酸转移酶系统 (PTS)、磷酸肌醇代谢、果糖和甘露糖代谢、磷酸戊糖途径等与宿主营养消化相关通路均显著上调 ($P<0.001$), 尤其是在糖代谢途径中的丙酮酸发酵途径、磷酸戊糖途径、糖酵解途径分别上调 8.44 倍、4.19 倍和 2.90 倍 (图 4: B)。随后对宿主消化能力进行验证, 发现肠道主要消化酶活力显著提升, 如胰蛋白酶、蔗糖酶、脂肪酶活力分别提升 ($13\ 993\pm665$) U/mL ($t=8.404$, $df=10$, $P=0.001\ 1$)、(0.52 ± 0.06) U/mL ($t=6.986$, $df=10$, $P=0.002$)、(0.04 ± 0.01) U/mL ($t=4.884$, $df=10$, $P=0.0081$), 尤其是淀粉酶活力相较于对照组差异极显著, 活力提升 (0.68 ± 0.01) U/mL ($t=37.24$, $df=10$, $P<0.001$) (图 4: C)。

3 讨论

宿主与微生物之间的互作关系主要发生在肠道内壁。经过宿主消化后的食物残渣及其代谢产物, 能够为微生物提供丰富的营养物质和稳定的繁殖场所, 这也是肠道微生物的聚集的重要原因之一 (Engel and Moran, 2013)。作为回报, 肠道微生物在维持自身群落稳态的同时还会与宿主协同进化, 参与调节宿主生理功能 (Fan *et al.*, 2018)。

肠道微生物大致可以分为暂存微生物与核心微生物两大类, 多数肠道微生物群落会随着个体发育阶段而存在差异, 部分环境微生物也会随着昆虫的取食而暂存于肠道组织并最终随着排泄、蜕皮等生理活动而排出体外 (Sonawane *et al.*, 2016)。而另一部分肠道菌群在幼虫孵化之初即可长期存在于肠道组织内, 与亲本保持着高度的同源性。通常肠道菌群多样性往往在幼虫发育初期即达到峰值, 随着龄期的增加反而逐渐减少 (Liang *et al.*, 2019)。这是由于低龄幼虫生长迅速, 需要依靠大量的取食行为供给自身发育, 而微生物能够帮助宿主拓宽从食物中获取营养底物种类, 提高食物利用率, 促进个体对养分的吸收。然而, 随着昆虫龄期的增长, 幼虫发育速率减缓、取食频率逐渐降低, 部分肠道微生物无法有效从食物中获取能量来源, 导致菌群竞争

力下降, 最终被其它菌群替代。而这些未被替代的菌群通常能够长期定殖于宿主肠道并与宿主协同进化, 对维持肠道菌群的稳态以及正常生理功能具有重要意义 (Jahnes and Sabree, 2020)。

肠道微生物群落的稳态与其生境条件紧密相关, 当小金蝠蛾遭受冬虫夏草菌侵染后, 菌群结构差异明显。外源真菌可以通过呼吸作用、营养消耗等方式从虫体内竞争获得原本属于肠道菌群的能量物质, 从而打破原有的物质循环, 破坏微生物共存关系, 推动菌群结构改变 (Litvak *et al.*, 2017)。例如在变形菌门中, 大多微生物具有专性好氧或兼性厌氧的特性, 在含氧环境中可以有效利用呼吸代谢产生的发酵产物供给自身 (Shin *et al.*, 2015)。当引入冬虫夏草菌以后, 该种真菌同样会进行有氧呼吸, 造成虫体氧含量逐步降低 (Litvak *et al.*, 2017), 导致变形菌适合度与生态位竞争力降低, 促使更具有生态适应性的菌群迅速繁殖 (Xia *et al.*, 2020)。

除了氧气含量变化对微生物适合度的影响以外, 营养竞争则是驱动微生物菌群更替的另一关键因素 (杨广容等, 2018)。小金蝠蛾幼虫在受到冬虫夏草菌定殖后, 厚壁菌门微生物代替原有的变形菌门成为肠道优势菌群。这些厚壁菌门微生物通常具有一层较厚的细胞壁, 能够在极端环境中均表现出较强的耐受力, 同时, 该类微生物属于严格厌氧或兼性厌氧型微生物, 它们通常具有一套特殊的无氧呼吸跨膜电子传递链, 能够利用非发酵型碳源供给自身, 极大的提升了能量利用效率 (Schade and Weidenmaier, 2016)。也正是得益于独特的细胞结构和营养利用模式, 造就了厚壁菌门在复杂肠道环境中的优势地位。

进一步对更替后的肠道优势菌门功能进行注释, 发现厚壁菌门微生物能够积极参与宿主的营养与代谢功能。通常, 这些厚壁菌门微生物自身可以代谢产生宿主所必须的芳香族氨基酸, 如常见的色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等物质, 均能作为消化反应底物改善肠道柱细胞的通透性 (Liang *et al.*, 2019)。同时, 厚壁菌门中的乳酸菌更是一类促进肠道消化的有益菌群, 不仅能够参与食物发酵, 更能代谢合成丙酮酸类物质, 参

与糖酵解途径, 促进宿主对营养的分解与吸收。此外, 还有研究指出, 厚壁菌门微生物能够有效利用高脂饲料中的营养物质, 能够降解食物中的天然大分子化合物, 并将其转化为宿主体内的脂肪供给自身发育 (Xiao *et al.*, 2021)。

综上所述, 肠道微生物是参与宿主正常生理活动、维持宿主健康的重要器官。在冬虫夏草形成过程中, 由于外源冬虫夏草菌的定殖打破虫体内原有生境条件, 导致肠道微生物呈现出规律性变化, 驱使更具有耐受力的厚壁菌门成为优势菌群, 而更替后的菌群也会直接促进宿主对营养的吸收与利用, 而这也可能是造成冬虫夏草虫菌共存期漫长的关键。这些额外产生的能量物质又是否会被冬虫夏草菌掠夺, 亦或是供给昆虫用于提高自身免疫功能仍不得知。为此, 更应当深入挖掘微生物群落、宿主彼此之间的内在关联, 共同阐释冬虫夏草形成过程中共生菌群与外源真菌的互作模式, 为后续调控肠道微生物群落、缩短冬虫夏草培育周期奠定理论基础。

参考文献 (References)

- Chen YC, Chen YH, Pan BS, Chang MM, Huang BM, 2017. Functional study of *Cordyceps sinensis* and cordycepin in male reproduction: A review. *J. Food Drug Anal.*, 25(1): 197–205.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699–735.
- Fan ST, Nie SP, Huang XJ, Wang S, Hu JL, Xie JH, Nie QX, Xie MY, 2018. Protective properties of combined fungal polysaccharides from *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma atrum* on colon immune dysfunction. *Int. J. Biol. Macromol.*, 114(9): 1049–1055.
- Jahnes BC, Sabree ZL, 2020. Nutritional symbiosis and ecology of host-gut microbe systems in the Blattodea. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 39: 35–41.
- Jing TZ, Wang FX, Qi FH, Wang ZY, 2018. Insect anal droplets contain diverse proteins related to gut homeostasis. *BMC Genomics*, 19(1): 784.
- Liang Y, Hong YH, Mai ZH, Zhu QJ, Guo LX, 2019. Internal and external microbial community of the thitarodes moth, the host of *Ophiocordyceps sinensis*. *Microorganisms*, 7(11): 7110517.
- Litvak Y, Byndloss MX, Tsois RM, Bäuml AJ, 2017. Dysbiotic proteobacteria expansion: A microbial signature of epithelial dysfunction. *Curr. Opin. Microbiol.*, 39(5): 1–6.
- Liu F, Wu XL, Yin DH, Chen SJ, Zeng W, 2006. Survey on the species and distribution of host insects of *Cordyceps sinensis*. *Chongqing Journal of Research on Chinese Drugs and Herbs*, 23(1): 47–50. [刘飞, 伍晓丽, 尹定华, 陈仕江, 曾伟, 2006. 冬虫夏草寄主昆虫的种类和分布研究概况. 重庆中草药研究, 23(1): 47–50.]
- Luckhart S, Riehle MA, 2020. Midgut mitochondrial function as a gatekeeper for malaria parasite infection and development in the mosquito host. *Front Cell Infect Microbiol.*, 3389(10): 593159.
- Schade J, Weidenmaier C, 2016. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins. *FEBS Lett.*, 590(21): 3758–3771.
- Shayla S, Melissa W, Naomi EP, 2018. Cycad-feeding insects share a core gut microbiome. *Biol. J. Linn. Soc.*, 123(4): 728–738.
- Shin NR, Whon TW, Bae JW, 2015. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.*, 33(9): 496–503.
- Sonawane MS, Chaudhary RD, Shouche YS, Sayyed RZ, 2016. Insect gut bacteria: A novel source for siderophore production. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.*, 88(2): 567–572.
- Xia XF, Lan BM, Tao XP, Lin JH, You MS, 2020. Characterization of *Spodoptera litura* gut bacteria and their role in feeding and growth of the host. *Frontiers in Microbiology*, 10(11): 1492–1496.
- Xiao FS, Zhu WQ, Yu YH, He ZL, Wu B, Wang C, Shu LF, Li XH, Yin HQ, Wang JJ, Juneau P, Zheng XF, Wu YJ, Li J, Chen XJ, Hou DW, Huang ZJ, He JG, Xu GH, Xie LW, Huang J, Yan QY, 2021. Host development overwhelms environmental dispersal in governing the ecological succession of zebrafish gut microbiota. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 7(1): 5.
- Yan JK, Wang WQ, Wu JY, 2014. Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: a review. *J. Funct. Foods*, 6(1): 33–47.
- Yang GR, Ma Y, Jiang B, Ma HJ, Xie J, Lv YC, Li YM, 2018. Analysis of the bacterial community and diversity in tea plantation soil via 16S rDNA sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 39(22): 8452–8461. [杨广容, 马燕, 蒋宾, 马会杰, 谢瑾, 吕才有, 李永梅, 2018. 基于 16S rDNA 测序对茶园土壤细菌群落多样性的研究. 生态学报, 39(22): 8452–8461.]
- Ying MX, Yu Q, Zheng B, Wang H, Wang JQ, Chen SP, Nie SP, Xie MY, 2020. Cultured *Cordyceps sinensis* polysaccharides modulate intestinal mucosal immunity and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice. *Carbohydr Polym.*, 235(9): 115957.
- Zhang Y, Liu X, Mu W, 2008. Cloning, expression, and characterization of two novel cuticle-degrading serine proteases from the entomopathogenic fungus *Cordyceps sinensis*. *Res. Microbiol.*, 159(6): 462–469.
- Zhang Q, Tu YQ, Zhang WJ, Zhang H, Qing YS, Liu H, 2015. The effect of high temperature stress on the catalase and peroxidase activities of *Hepialus xiaojinensis* larvae. Proceedings of the 2015 Annual Conference of the Chinese Society of Plant Protection. Changchun: 125. [张青, 涂永勤, 张文娟, 张航, 覃语思, 刘怀, 2015. 高温胁迫对小金蝠蛾幼虫过氧化氢酶、过氧化物酶活性的影响. 病虫害绿色防控与农产品质量安全——中国植物保护学会 2015 年学术年会论文集. 长春: 125.]