



贵阳地区蝉花微生态系统中细菌种群结构与功能

牟丹¹, 曾召英¹, 钟文琳¹, 周家喜¹, 瞿娇娇², 邹晓^{1*}

¹ 贵州大学生命科学学院真菌资源研究所, 贵州 贵阳 550025

² 贵州大学茶学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 【目的】探索自然生态下蝉花内菌核、菌膜和环境细菌群落结构、功能及其相互关系。【方法】对细菌16S rRNA扩增片段进行高通量测序, 分析贵阳市大将山和贵阳森林公园的蝉花内菌核、菌膜及其生境土壤的细菌群落组成、多样性及潜在功能。【结果】蝉花内菌核样本共检测到细菌562个属, 菌膜样本521个属, 菌际土样本578个属。两地的各组样本细菌群落结构相似, 内菌核样本中假单胞菌属 *Pseudomonas*、沙雷氏菌属 *Serratia* 占优势地位; 菌膜样本中假单胞菌属和氨基杆菌属 *Aminobacter* 占优势; 土壤样本以未分类的酸杆菌纲 *Acidobacteria* 和黄杆菌科 *Xanthobacteraceae* 为优势属。Venn图分析显示, 菌际土样本包括了菌膜样本的大多数属, 内菌核样本拥有较多的特有属, 如沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 和立克次氏体 *Rickettsia* 等。PICRUSt功能预测结果显示, 共计24个基因功能家族, 主要与物质能量的代谢运输、细胞的行为发生及调控等功能相关。【结论】蝉花及其微生境中细菌具有丰富多样性, 它们的潜在功能可能与营养物质的新陈代谢有关, 对蝉花的个体生长发育有重要作用。研究结果对蝉花虫草的生态信息数据补充和仿野生栽培具有参考价值。

关键词: 蝉花, 细菌群落, 高通量测序, PICRUSt

蝉花(*Cordyceps cicadae*), 别名蝉草、蝉茸、胡蝉等, 是一种由虫草科真菌蝉棒束孢 *Isaria cicadae* 侵染蝉若虫所形成的虫菌复合体^[1]。蝉花在我国多分布于长江以南的亚热带和热带地区, 一般生长在针阔叶混交林的缓坡或低洼地带^[2-3]。

其作为一种著名的中药, 长期以来被用于治疗疲劳、盗汗、发热、儿童惊厥、心悸、头晕等病症^[4]。除药理作用外, 蝉花还是一种昆虫病原真菌, 对鳞翅目^[5]、同翅目^[6]的多种昆虫具有致病性, 其在生物防治中的潜力也不容忽视。近年来,

基金项目: 国家自然科学基金(31860037); 贵州省科技厅项目(黔科合支撑[2019] 2405 号, 黔科合基础[2020] 1Z009)

*通信作者。E-mail: xzou@gzu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-19; 修回日期: 2020-09-29; 网络出版日期: 2020-11-05

人们对蝉花中营养成分的认识不断加深,市场上对蝉花的需求量也不断增加。然而,野生蝉花资源有限,难以满足市场需求,因此人们开始探索蝉花的人工培养。目前对蝉花的人工培养方式主要包括液体发酵、固体培养和虫体培养等^[7]。

蝉花作为一种虫生真菌,它的形成与其居群所生存的生态环境有着密切关系。有研究者发现,虫生真菌冬虫夏草及其土壤微生境中具有高度多样性的真菌和细菌群落^[8-9]。近年来,高通量测序技术被用来分析蝉花的微生物群落结构,结果显示蝉花内生真菌主要为棒束孢属 *Isaria*^[10]。另有研究表明,蝉花不同部位和在不同生长时期都具有丰富的内生真菌资源^[11]。但这些研究大多集中在蝉花的真菌多样性,而对其中的细菌研究较少。共生或内生细菌作为寄主微生态系统的自然组成部分,可以影响寄主的生长和代谢产物的产生^[12]。大量研究表明真菌细菌共同作用对某些活性物质含量具有促进作用,如土曲霉与芽孢杆菌共培养发现其真菌天然产物积累明显增加^[13];镰刀菌与枯草芽孢杆菌共培养后几种次生代谢物的产量大量提高^[14];西地西菌属的细菌与蝉棒束孢共培养可促进蝉花 HEA 产量提高,且该菌属在蝉花体内有较高丰度^[15]。因此,要获得与野生蝉花接近的人工培养物,除了解其真菌群落结构信息^[16],对其细菌群落结构及功能进行研究也是非常必要的。

本研究采用高通量测序技术对蝉花内菌核、菌膜及其周围环境土壤细菌群落进行检测,并对其进一步进行 16S 功能预测,旨在进一步了解蝉花内外环境中细菌群落组成及多样性,分析细菌群落所承担的生态功能,有利于加深理解蝉花生长过程对环境的适应机制,了解蝉花内菌核、菌膜及环

境微生物之间的生态关系,从而提高蝉花仿野生栽培质量。

1 材料和方法

1.1 样本采集与处理

样本于 2018 年 7 月采自贵州省贵阳市大将山(djs, 106.6899E, 26.4373N)和贵阳森林公园(slg, 106.7625E, 26.5531N)。参照曾召英等^[16]取样方法:在 2 个采样点各采集 3 株野生蝉花,同时将蝉花及其周围 5 cm 内、深度与虫体底部平行的土壤一同采集,采用三点取样法取 5、2 及 1 cm 处的土壤约 10 g 于密封袋中;除此还采集了同一小生境下无蝉花生长处的土壤,样本均低温带回实验室, -20 °C 冰箱保存。两地采集的样本各分为 7 组:(1) 无蝉花生长的环境土壤(environmental soil, ES);(2) 距离虫体 5 cm 的生境土壤(5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, S5);(3) 距离虫体 2 cm 的生境土壤(2 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, S2);(4) 距离虫体 1 cm 的生境土壤(1 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, S1);(5) 取紧紧包裹虫体约 0.2 cm 的土壤作为菌际土样本(hyphosphere soil, HS);(6) 去除蝉花表面土壤后,用镊子剥下紧紧包裹虫体的表面菌丝皮层为菌膜样本(cortices, Cor);(7) 剥掉菌膜去除虫体体壁后的样本为内菌核(sclerotia, Scl)。除环境土样本外,其余样本均 3 个重复,共 38 个样本。

1.2 细菌总 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

参照 E.Z.N.A.[®] SoIL DNA Kit 试剂盒(美国 OMEGA 公司)说明方法提取微生物总 DNA。PCR 扩增采用 TransStart Fastpfu DNA Polymerase,

20 μL 反应体系: 5 \times FastPfu Buffer 4 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物 338F (5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')各 0.8 μL , FastPfu Polymerase 0.4 μL , BSA 0.2 μL , 模板 DNA 10 ng, 补充 ddH₂O 至 20 μL 。反应体系置于 ABI Gene Amp[®]9700 型 PCR 仪进行扩增, PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 直至反应停止。扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司, 利用 Illumina Miseq 测序平台进行测序。

1.3 数据处理

1.3.1 序列处理及 OTU 注释: Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列, 并校正序列方向, 得到优化序列。利用 Uparse 软件(<http://www.drive5.com/uparse/>)按照 97%相似性对非重复序列进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 代表序列, 使用 RDP 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/>)对 OTUs 进行物种注释。使用 Mothur 方法(http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)计算各组样本的 Shannon 指数、Simpson 指数、Ace 指数、Chao 指数及 Coverage 指数等, 并进行 α 多样性分析及显著性差异比较。

1.3.2 细菌群落结构分析: 将每组样品相对丰度大于 1.0%的细菌类群作百分比堆积柱形图, 相对丰度小于 1.0%归于其他(相对丰度为每组样本 3 个重复的平均值); 通过 Venn 图分析内菌核、菌膜及菌际土之间的共有属和特有属; 运用单因素方差分析(one-way ANOVA)对不同样本

细菌群落丰度排前 15 的属进行组间显著性差异分析, 获得各样本组间差异显著性物种。

1.3.3 细菌功能预测: 利用 PICRUSt (<http://picrust.github.io/picrust/>)对细菌的 16S 序列进行 COG 和 KEGG 功能注释, 获得 OTU 在 COG、KEGG 各功能水平的注释信息和各功能在不同样本中的丰度信息^[17]。

2 结果和分析

2.1 高通量测序结果

稀释曲线分析发现, 随着样品序列数的增加稀释曲线趋向平坦, 表明本次高通量测序数据合理, 测序深度能覆盖样本细菌群落中的绝大多数物种。经过优化处理, 本次测序 38 个样本共得到 1909133 条有效序列, 共 836819563 个碱基, 各样本序列数为 38168–70811, 序列长度为 266–535 bp。以 97%的一致性对序列进行 OTU 聚类, 大将山和森林公园两地 14 组样本共检测到 40 门 91 纲 193 目 378 科 739 属 1471 种 4342 个 OTUs。所有样品的覆盖度指数均达到 0.98 以上, 表明本次测序所测得的数据足够反映蝉花及其微生境中细菌群落的多样性(表 1)。对不同样本 α 多样性指数进行比较分析, 反映样本细菌丰富度的 Ace 和 Chao 指数分别为 805.787–3003.783 和 478.861–3032.911, 其中两地的土壤样本丰富度均显著高于内菌核和菌膜样本, 而菌膜样本的丰富度显著高于内菌核样本。反映样本细菌多样性的 Shannon 和 Simpson 指数表明, 土壤样本多样性显著高于内菌核和菌膜样本, 菌膜和内菌核样本间细菌多样性无显著性差异; 距蝉花不同距离的各土壤样本间细菌多样性差异没有达到显著水平, 说明各土壤样本细菌群落结构相似。

表 1. 14 组样本细菌 Alpha 多样性指数
Table 1. Statistics of alpha diversity of bacterial community in 14 samples

Site	Samples	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage
Mount Dajiang	djs_Scl	2.158±1.341a	0.269±0.188a	805.787±398.813a	478.861±82.946a	0.997±0.002e
	djs_Cor	3.378±1.078a	0.118±0.098ab	1518.63±352.213b	1360.39±483.065bc	0.99±0.004cd
	djs_HS	5.872±0.577b	0.012±0.011b	2266.796±218.777cd	2280.577±214.969d	0.985±0.001abc
	djs_S1	6.295±0.095b	0.006±0.002b	2414.219±16.866de	2424.064±29.935d	0.985±0.001abc
	djs_S2	6.286±0.094b	0.006±0.001b	2495.183±112.738de	2483.987±112.965d	0.984±0.002abc
	djs_S5	6.133±0.189b	0.007±0.001b	2458.646±97.231de	2491.568±59.443d	0.984±0.00ab
	djs_ES	5.383	0.014	1573.989	1569.476	0.990
Guiyang Forest Park	slgy_Scl	3.156±1.367a	0.156±0.127ab	853.393±655.331a	824.837±653.787ab	0.995±0.006de
	slgy_Cor	2.933±1.900a	0.246±0.195a	1839.933±604.137bc	1465.783±881.122c	0.989±0.007bc
	slgy_HS	6.473±0.184b	0.005±0.001b	2877.249±221.228e	2898.074±215.45d	0.982±0.002a
	slgy_S1	6.581±0.038b	0.004±0.001b	2908.017±93.454e	2949.329±77.869d	0.982±0.001a
	slgy_S2	6.475±0.048b	0.004±0.00b	2816.143±58.193de	2830.499±63.932d	0.983±0.00a
	slgy_S5	6.451±0.023b	0.005±0.00b	2884.673±73.021e	2915.946±87.733d	0.982±0.001a
	slgy_ES	6.635	0.004	3003.783	3032.911	0.982

djs: Mount Dajiang; slgy: Guiyang Forest Park; Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil.

2.2 细菌群落结构分析

2.2.1 门水平上细菌群落组成：在门水平上 (图 1)，两地的菌膜和内菌核样本结构相似，以变形菌门 *Proteobacteria*、拟杆菌门 *Bacteroidetes*

和放线菌门 *Actinobacteria* 为主要细菌类群，其中变形菌门为优势菌群，占 76.38%–82.01%；其次是拟杆菌门，占 4.07%–17.49%。各土壤样本细菌群落结构相似，变形菌门、放线菌门、酸杆

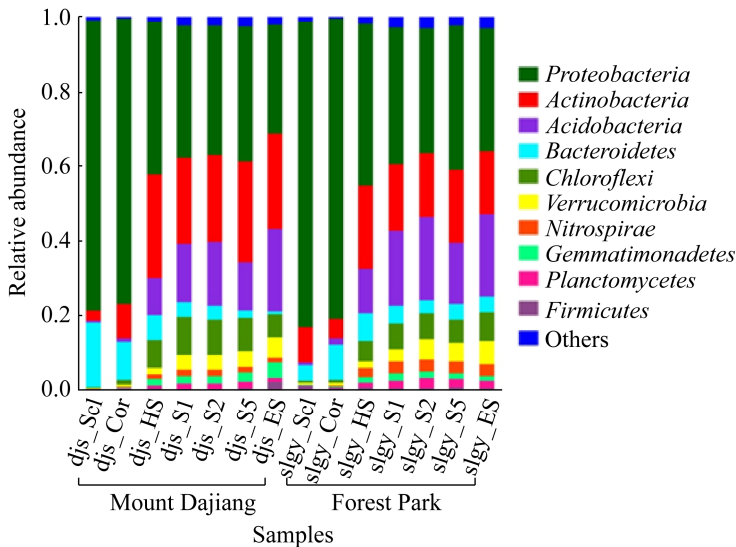


图 1. 门水平上群落组成相对丰度柱形图

Figure 1. Relative abundance histogram of community composition at phylum level. djs: Mount Dajiang; slgy: Guiyang Forest Park; Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil.

菌门 *Acidobacteria*、绿弯菌门 *Chloroflexi* 和疣微菌门 *Verrucomicrobia* 为主要细菌类群, 其中变形菌门为优势菌群(29.28%–43.35%), 其次是放线菌门(17.07%–27.74%)和酸杆菌门(9.92%–22.25%)。

2.2.2 属水平上细菌群落组成: 在属水平上(图 2), 大将山和森林公园两地的内菌核样本均检测到的细菌群落主要有假单胞菌属 *Pseudomonas*、沙雷氏菌属 *Serratia*、鞘脂杆菌属 *Sphingobacterium*、氨基杆菌属 *Aminobacter* 等; 其中大将山内菌核样

本以假单胞菌属(23.68%)、沙雷氏菌属(16.65%)、鞘脂杆菌属(12.70%)、立克次氏体 *Rickettsia* (6.54%)、无色杆菌属 *Achromobacter* (5.60%)、金黄杆菌属 *Chryseobacterium* (3.95%)和氨基杆菌属(3.67%)为优势属; 而森林公园内菌核样本除沙雷氏菌属(15.87%)和假单胞菌属(14.81%)占主要优势外, 沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* (11.61%)、劳尔氏菌属 *Ralstonia* (4.17%)、剑菌属 *Ensifer* (4.14%)和氨基杆菌属(3.94%)也占一定优势。两地的菌膜

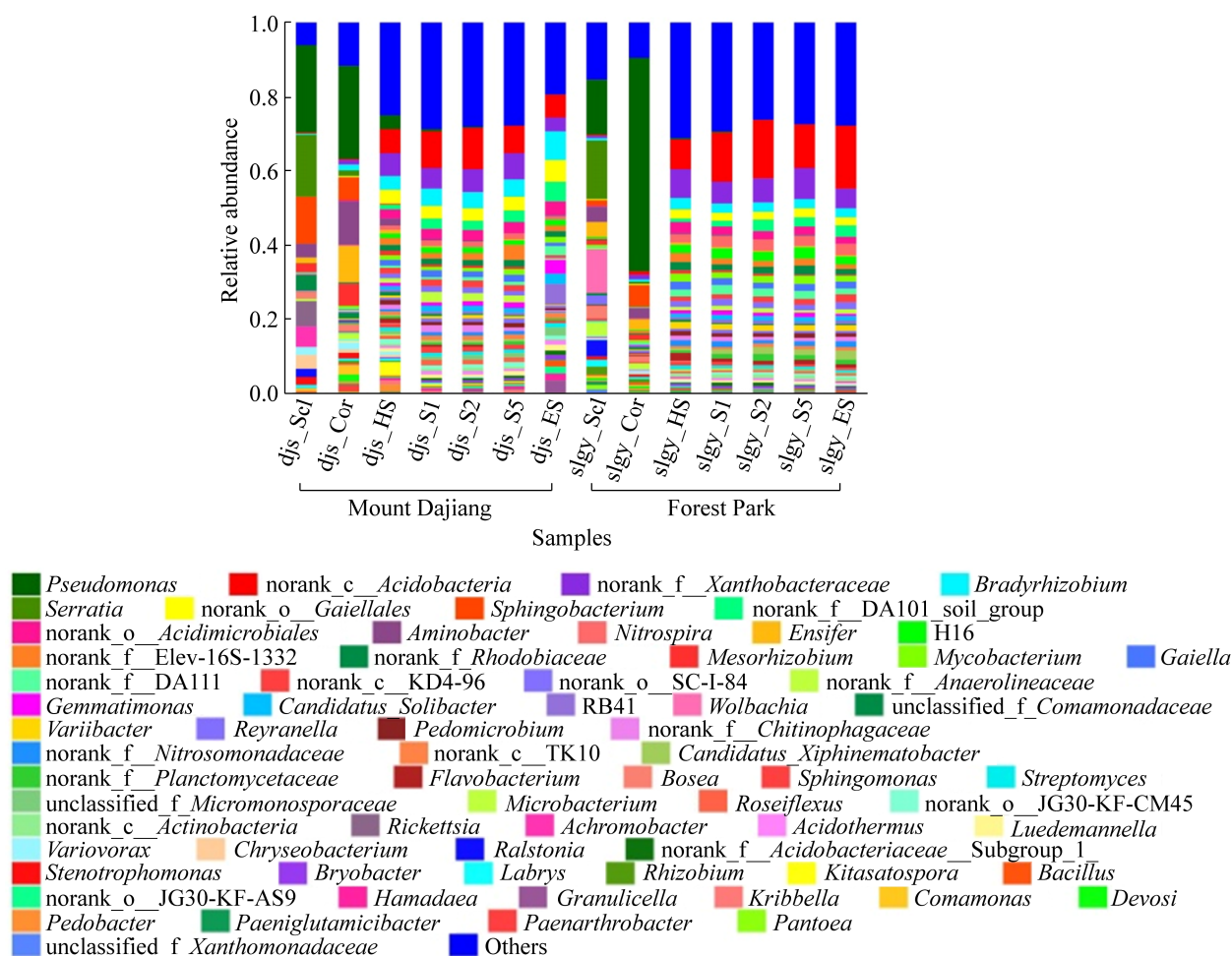


图 2. 属水平上群落组成相对丰度柱形图

Figure 2. Relative abundance histogram of community composition at the genus level. djs: Mount Dajiang; slgy: Guiyang Forest Park; Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil.

样本中均检测到的细菌主要有假单胞菌属、鞘脂杆菌属、剑菌属、氨基杆菌属及中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* 等；其中大将山菌膜样本以假单胞菌属(25.14%)、氨基杆菌属(11.73%)、剑菌属(9.57%)为优势属，鞘脂杆菌属(6.04%)、中慢生根瘤菌属(5.92%)和丛毛单胞菌属 *Comamonas* (2.42%)占次要优势；森林公园菌膜样本中假单胞菌属(57.72%)占绝对优势，另外还有鞘脂杆菌属(6.01%)、剑菌属(3.03%)和氨基杆菌属(2.48%)占较大比例。两地的土壤样本细菌群落组成相似，主要由未分类的酸杆菌纲 *Acidobacteria* (6.38%–16.98%)、未分类的黄色杆菌科 *Xanthobacteraceae* (3.68%–8.25%)、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* (2.38%–7.52%)、norank_o_Gaiellales (2.04%–6.04%)及 norank_f_DA101_soil_group (0.92%–5.24%)等组成，其中大将山环境土样本慢生根瘤菌(7.52%)优势较大，而森林公园环境土中未分类的酸杆菌纲 *Acidobacteria* (16.98%)占较大优势。

2.3 细菌群落共有属分析

对森林公园和大将山两地的蝉花内菌核(Scl)、菌膜(Cor)及菌际土(HS) 3 组样本作 Venn 图分析，结果表明内菌核样本检测到细菌 562 属，菌膜样本中细菌 521 属，菌际土样本中细菌 578 属 (图 3)。其中内菌核、菌膜和菌际土 3 个样本共有细菌 400 个属，如假单胞菌属、沙雷氏菌属等。内菌核与菌膜单独共有 17 属，内菌核与菌际土共有 23 个属，而菌膜与菌际土共有 96 个属。内菌核拥有 122 个特有属，如沃尔巴克氏体属和立克次氏体等；菌际土拥有 59 个特有属，而菌膜仅有 8 个特有属，如 *Akkermansia* 等。菌际土样本包括了菌膜样本中大部分的细菌，推测菌膜样本中的细菌主要来源于菌际土壤，部分可能来源于蝉花内菌核。

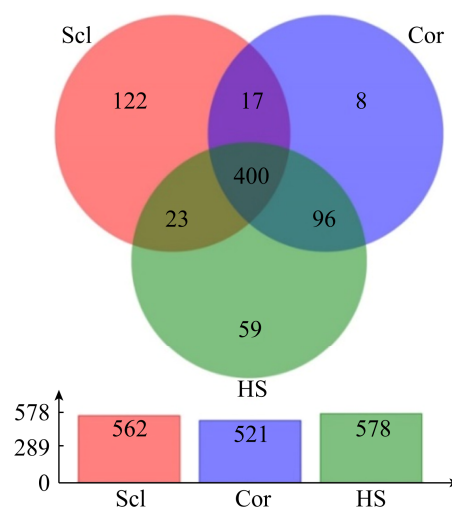


图 3. 蝉花不同样本共有属 Venn 图

Figure 3. Venn diagram of common genus in different samples of *Cordyceps cicadae*. Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil. The abundance is the mean of the two places.

2.4 各样本间优势细菌丰度显著性差异分析

组间显著性差异检验结果显示，内菌核、菌膜和菌际土之间存在较多显著性差异物种。其中假单胞菌属、沙雷氏菌属、氨基杆菌属、剑菌属和鞘脂杆菌属在内菌核和菌膜样本中丰度所占比例较大，在菌际土样本中较少，但这几个细菌属在 3 个样本间差异均未达到显著水平($P>0.05$)。norank_c_Acidobacteria、norank_f_Xanthobacteraceae、慢生根瘤菌属、norank_o_Gaiellales、norank_c_Acidimicrobia 在菌际土样本中丰度较大，且在 3 组样本间丰度差异达到极显著水平($P<0.01$) (图 4-A)。对距蝉花不同距离的土壤样本进行显著性差异分析，结果发现仅 norank_f_DA101_soil_group 这 1 个细菌属丰度存在显著性差异，其余细菌无显著性差异，可以证明两地的各土壤样本细菌群落结构相似，蝉花的生长对土壤细菌群落结构影响不大(图 4-B)。

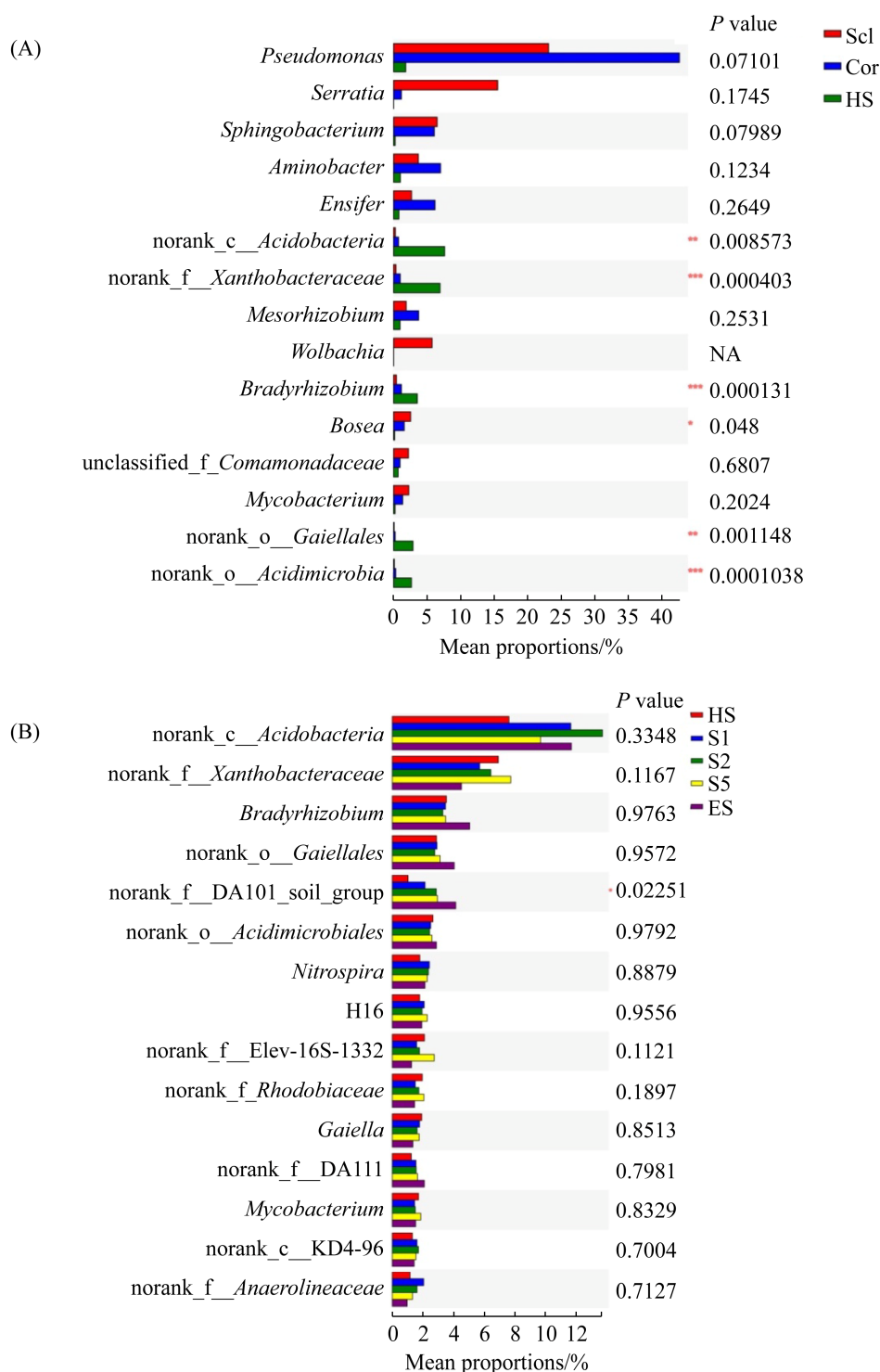


图 4. 不同样本组间显著性差异分析

Figure 4. Analysis of significant differences between different groups. A: Analysis of significant differences among the groups of Scl, Cor and HS; B: Analysis of significant differences between soil groups. Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil. The abundance is the mean of the two places.

2.5 16S 功能预测分析

为了获得不同样本中细菌的功能,本研究通过 PICRUSt 进行菌群功能预测分析发现,所有样本细菌 KEGG pathway 丰度基本相似(图 5)。其中与新陈代谢 Metabolism 相关的占大多数(48.78%–52.65%);其次是环境信息处理 Environmental Information Processing (13.41%–19.59%)、遗传信息处理 Genetic Information Processing (13.07%–16.11%)和未分类相关信息 Unclassified (12.54%–13.58%);还有部分参与细胞转化 Cellular Processes (2.99%–4.04%)的信息,与人类疾病 Human Diseases 相关的信息丰度达到 0.96%–1.34%,另外也有少部分与有机系统 Organismal Systems (0.67%–0.83%)相关的信息。

COG 数据库预测功能分类显示,细菌群落共计 24 个基因功能家族,主要为物质与能量的代谢运输、细胞的行为发生及调控等功能(图 6)。主

要包括氨基酸转运与代谢(amino acid transport and metabolism, 8.44%–10.32%)、能量产生与转换(energy production and conversion, 6.61%–7.35%)、转录(transcription, 6.43%–7.94%)、碳水化合物运输与代谢(carbohydrate transport and metabolism, 6.04%–7.37%)、细胞壁/细胞膜及包膜的生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis, 5.80%–7.01%)、无机离子运输与代谢(inorganic ion transport and metabolism, 5.29%–7.13%)、信号转导机制(signal transduction mechanisms, 4.59%–7.07%)等主要功能基因家族;另外,一般功能预测(general function prediction only)和未知功能(function unknown)的基因家族分别占 8.45%–8.83%和 9.27%–10.45%。PICRUSt 预测的基因功能结果显示,蝉花细菌群落功能信息大多为有益信息,推测其在蝉花的个体发育过程中扮演着重要角色。

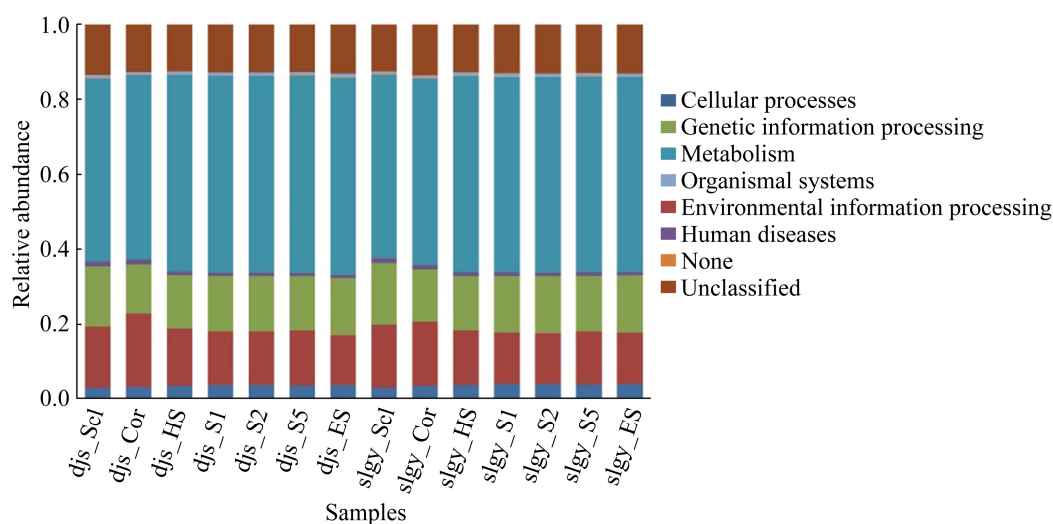


图 5. OTU 水平不同样本细菌 KEGG pathway 相对丰度

Figure 5. Relative abundance of KEGG pathway in different samples at OTU level. Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil.

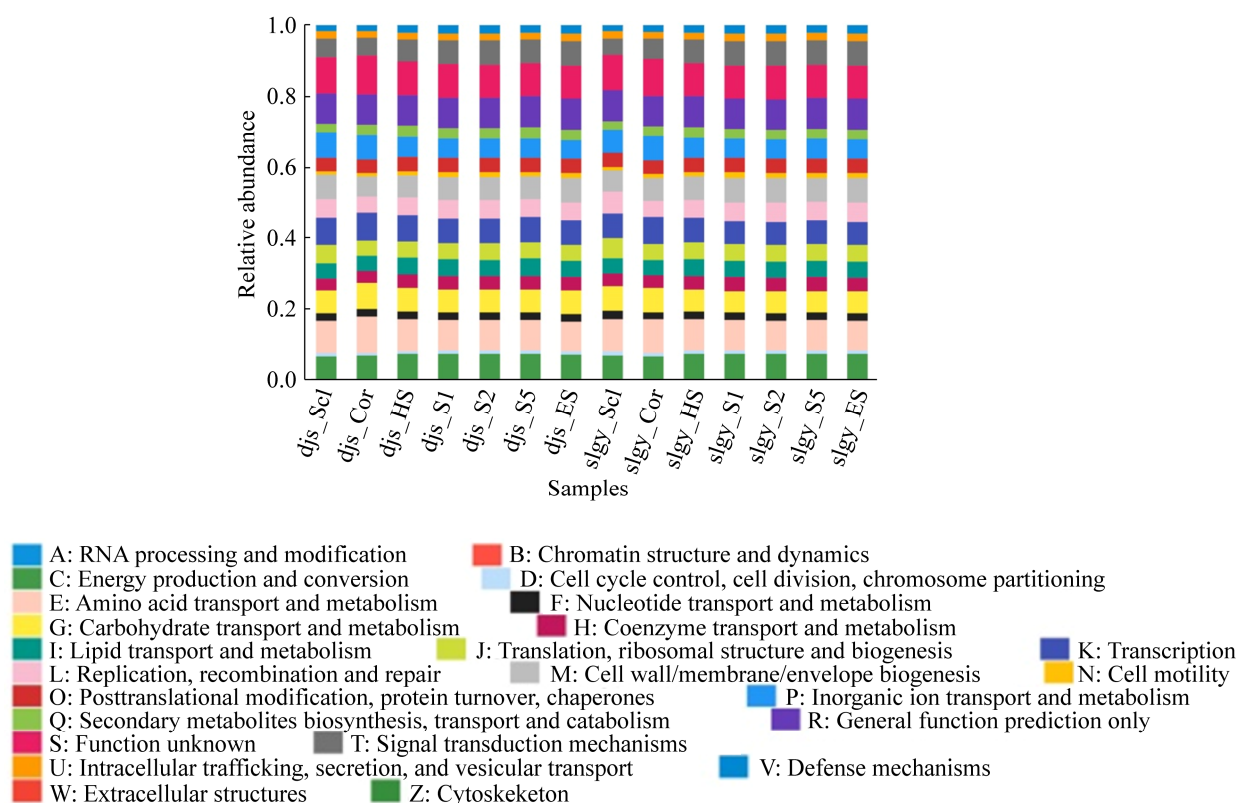


图 6. OTU 水平各样本细菌 COG 功能分类

Figure 6. Functional classification of COG in each sample of bacteria at OTU level. Scl: Sclerotia; Cor: Cortices; HS: Hyphosphere soil; S1, S2 and S5: 1, 2, 5 cm soil around the *Cordyceps cicadae*, respectively; ES: Environmental soil.

3 讨论

在之前的报道中, 研究者们通过高通量测序技术发现蝉花真菌群落主要包括蝉棒束孢菌和其他的一些真菌属存在, 如隐球酵母属 *Cryptococcus*、被孢霉属 *Mortierella* 等^[16,18]。近年来, 16S rRNA 序列分析被用来研究细菌群落多样性, 该技术可以实现对细菌进行快速、微量、准确简便地分类鉴定和检测^[19-20]。同时 16S rRNA 基因测序也面临着一系列的问题与挑战, 如不能精准定量分析微生物群落多样性、物种相对丰度难以准确评估等, 但随着 16S rRNA 相关数据库

的信息补充以及生物信息学分析及算法的不断开发, 将为微生物群落多样性研究提供更加准确和全面的信息^[21]。本研究对蝉花微生态系统中细菌 16S rRNA 扩增片段进行高通量测序共得到 1909133 条有效序列, 4342 个 OTUs; PICRUSt 功能预测共计 24 个基因功能家族, 表明蝉花内菌核、菌膜及其微生境中细菌多样性和功能丰富。蝉花细菌群落以变形菌门为优势类群, 淳于彦洁^[22]对蝉花不同部位的细菌群落结构进行研究也发现变形菌门为主要门组成, 与本研究结果一致。屈青松等^[23]研究表明安徽蝉花和浙江蝉花

内菌核分别以西地西菌属和伯克氏菌属 *Burkholderia* 为优势属, 而本研究中贵阳市两地蝉花内菌核中细菌主要以假单胞菌属、沙雷氏菌属、鞘脂杆菌属等为优势类群, 结果的不同可能是由于寄主和菌群的生态环境不同所致。这些细菌在属水平的差异是否可以作为蝉花菌群的地域性标志? 这需要更多不同产地蝉花信息数据的支撑和更长时间的观察。

对内菌核、菌膜和菌际土 3 组样本进行 Venn 分析, 3 组样本共有细菌 400 个属, 其中内菌核有 122 个特有属, 菌际土有 59 个特有属, 而菌膜仅有 8 个特有属, 这说明内菌核中的大多细菌为寄主的共生菌。分析发现, 蝉花菌膜与内菌核共有 17 属, 而与菌际土共有 96 个属。Yang 等^[24]研究发现真菌菌丝可以促进细菌在土壤中短距离或长距离迁移, 表明真菌菌丝对细菌是具有运输作用的。由于菌膜是在蝉花生长过程中由菌丝特化而成的膜质结构, 由此推测蝉花菌膜细菌大多来源于菌际土壤, 少部分可能来源于内菌核。菌膜作为虫生真菌与环境直接接触的界面, 其是否对内外环境中细菌具有一定的选择和运输作用, 这值得深入研究。

此外, 在两地的菌膜样本中均检测到了中慢生根瘤菌属、剑菌属等根瘤菌, 根瘤菌可与植物建立共生固氮关系^[25], 推测该类根瘤菌在蝉花与环境之间的 N 元素循环中扮演着重要的角色。通过 16S 基因功能预测发现, 各样本中存在大量与新陈代谢相关的基因信息, 这说明细菌可能参与了氨基酸、碳水化合物等营养物质的合成代谢,

为蝉花的生长发育提供了必要的营养。研究还发现大将山和森林公园蝉花内菌核样本特有属立克次氏体和沃尔巴克氏体属分别占一定的优势, 毛迎新等^[26]对小贯小绿叶蝉共生细菌多样性研究表明了这两种细菌均为蝉的共生菌, 它们不仅可以调节宿主的生殖活动, 还能增强宿主的抗逆性; 菌膜样本中的特有属 *Akkermansia* 的细菌 *Akkermansia muciniphila* 作为肠道微生物, 与机体的免疫应答、脂类代谢等过程有着密不可分的联系^[27]。这说明不同样本中特有菌群的特殊功能, 可能在蝉花个体发育历程中蝉棒束孢侵染寄主的这个阶段起重要作用。功能注释还发现了部分与人类疾病相关的功能基因, 如分枝杆菌属 *Mycobacterium*、黄杆菌属 *Flavobacterium* 等。分枝杆菌属有不少种是致病菌, 如引起结核病的结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*、引起麻风病的麻风分枝杆菌 *Mycobacterium leprae* 和引起布鲁里溃疡的溃疡分枝杆菌 *Mycobacterium ulcerans* 等^[28]; 黄杆菌属广泛存在于自然环境中, 是医院感染病的病原菌之一^[29]。除此之外, 野生蝉花中还有大部分未得到很好注释和功能未知的基因。

在“虫生真菌/土壤”的微生态系统中, 细菌群落具有丰富多样性, 并承担着丰富的功能。通过分析蝉花内菌核、菌膜及其微生境土壤中的细菌群落组成以及相互之间的关系, 对理解虫草类真菌侵染寄主后对环境的适应机制具有重要价值, 也可为蝉花及一些重要虫草的仿生态栽培技术和土壤物质循环提供生态依据。

参 考 文 献

- [1] Jiang N, Gao DW, Lin JS, Ma JX. Research progress of *Cordyceps cicadae*. *Jiangsu Agricultural Science*, 2017, 45(8): 11–14. (in Chinese)
蒋宁, 高大伟, 林金盛, 马建雄. 蝉花的研究进展. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 11–14.
- [2] Wang CL, Lu BZ, Hou GL. Study progress on *Cordyceps cicadae* in China. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2006, 41(4): 244–247. (in Chinese)
王春雷, 芦柏震, 侯桂兰. 中国蝉花的研究进展. *中国药理学杂志*, 2006, 41(4): 244–247.
- [3] Wang Q, Liu ZY. Advances in studies on medicinal fungi *Cordyceps cicadae*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2004, 34(4): 469–471. (in Chinese)
王琪, 刘作易. 药用真菌蝉花的研究进展. *中草药*, 2004, 34(4): 469–471.
- [4] Xu HY, Zhu Y, Cheng DQ. Research advances of Chinese medicine *Cordyceps cicadae*. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2008, 25(5): 27–29. (in Chinese)
许洪义, 朱燕, 程东庆. 中药蝉花的研究进展. *中医药信息*, 2008, 25(5): 27–29.
- [5] Liu YG, Wang GE, Li XL, Chai YQ, Jin YW. The pathogenicity of the spores of *Paecilomyces cicadae* on *Plutella xylostella*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2007, 44(2): 256–258. (in Chinese)
刘又高, 王根锬, 厉晓腊, 柴一秋, 金铁伟. 蝉拟青霉孢子粉对小菜蛾的致病性试验. *昆虫知识*, 2007, 44(2): 256–258.
- [6] Tan AJ, Ou X, Liu AY. Study on pathogenicity of *Paecilomyces cicadae* to *aphis medicginis koch*. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2009, 15(3): 50–52. (in Chinese)
谭艾娟, 欧翔, 刘爱英. 蝉拟青霉对蚕豆蚜虫致病性的初步研究. *天津农业科学*, 2009, 15(3): 50–52.
- [7] Teng Y, Song YL, Guan ZH. Research advances on artificial culture of *Cordyceps cicadae*. *Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 31(12): 111–112. (in Chinese)
滕晔, 宋玉良, 官宗华. 蝉花人工培养的研究进展. *内蒙古中医药*, 2012, 31(12): 111–112.
- [8] Xia F, Chen X, Guo MY, Bai XH, Liu Y, Shen GR, Li YL, Lin J, Zhou XW. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese *Cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33437.
- [9] Xia F, Liu Y, Guo MY, Lin J, Zhou XW. Pyrosequencing analysis revealed complex endogenetic microorganism community from natural DongChong XiaCao and its microhabitat. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 196.
- [10] Shi XS, Zhang HM, Liu TF, Liu ZY, Shi XY. Analysis on the diversity of endophytic fungus and identification of strain isolation in Chanhua. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2018, 33(9): 4074–4078. (in Chinese)
史晓飒, 张洪梅, 刘腾飞, 刘自尧, 史新元. 蝉花内生真菌多样性分析及菌株分离鉴定. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 4074–4078.
- [11] Chunyu YJ, Lu ZM, Luo ZS, Li SS, Li H, Geng Y, Xu HY, Xu ZH, Shi JS. Promotion of metabolite synthesis in *Isaria cicadae*, a dominant species in the cicada flower microbiota, by cicada pupae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(31): 8476–8484.
- [12] Wu YZ, Li JP, Li DD, Liu BJ, Hu JD, Li JS, Yang HT. Research progress on endohyphal bacteria and their symbiosis with host fungi. *Shandong Science*, 2020, 33(4): 34–45. (in Chinese)
吴远征, 李金萍, 李丹丹, 刘宝军, 扈进冬, 李纪顺, 杨合同. 菌丝内生细菌及其宿主真菌共生体系研究进展. *山东科学*, 2020, 33(4): 34–45.
- [13] Chen HQ, Daletos G, Abdel-Aziz MS, Thomy D, Dai HF, Brötz-Oesterhelt H, Lin WH, Proksch P. Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture. *Phytochemistry*, 2015, 12: 35–41.
- [14] Ola ARB, Thomy D, Lai DW, Brötz-Oesterhelt H, Proksch P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(11): 2094–2099.
- [15] Qu QS, Yang F, Zhao CY, Shi XY. Analysis of the bacteria community in wild *Cordyceps cicadae* and its influence on the production of HEA and nucleosides in *Cordyceps cicadae*. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(6): 1759–1767.

- [16] Zeng ZY, Xu ZS, Mou D, Xu SH, Du F, Zhou JX, Zou X. Analyses on the structure and ecological function of fungal community in sclerotia, external mycelial layer covering ossified cicada epidermis and habitat soil of *Isaria cicadae*. *Mycosystema*, 2019, 38(10): 1710–1723. (in Chinese)
曾召英, 许忠顺, 牟丹, 许绍欢, 杜飞, 周家喜, 邹晓. 蝉棒束孢内菌核、菌膜及其生境土壤真菌群落结构及生态功能分析. *菌物学报*, 2019, 38(10): 1710–1723.
- [17] Douglas GM, Beiko RG, Langille MGI. Predicting the functional potential of the microbiome from marker genes using PICRUSt//Beiko R, Hsiao W, Parkinson J. *Methods in Molecular Biology*, New York: Humana Press, 2018: 169–177.
- [18] Liu TF, Shi XS, Zhang HM, Zhang YC, Liu ZY, Liu YY, Shi XY. Analysis of fungal diversity of *Isaria cicadae* from different habitats by PCR-DGGE. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2017, 40(5): 1056–1060. (in Chinese)
刘腾飞, 史晓飒, 张洪梅, 张艳聪, 刘自尧, 刘元元, 史新元. PCR-DGGE 法分析不同产地蝉花真菌多样性. *中药材*, 2017, 40(5): 1056–1060.
- [19] Shan LY, Li YJ, Zheng S, Wei YM, Shang Y. Analysis of the bacterial floral structure and diversity of Xuanwei ham by 16S rDNA sequencing. *Journal of Food Safety*, 2020, 40(4): e12800, doi: 10.1111/jfs.12800.
- [20] Du LH, Liu F. Application of 16S rRNA gene in identification of bacteria. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2006, 29(5): 207–209. (in Chinese)
都立辉, 刘芳. 16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用. *乳业科学与技术*, 2006, 29(5): 207–209.
- [21] Huang ZQ, Qiu JX, Li J, Xu DP, Liu Q. Exploration of microbial diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20200336.
黄志强, 邱景璇, 李杰, 许东坡, 刘箐. 基于 16S rRNA 基因测序分析微生物群落多样性. *微生物学报*, 2020, doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20200336.
- [22] 淳于彦洁. 蝉花微生物群落结构研究及优势真菌的分离培养. 江南大学硕士学位论文, 2019.
- [23] Qu QS, Yang F, Zhao CY, Wang JR, Zeng JH, Shi XY. Isolation and diversity of *Cordyceps cicadae* endophytic bacteria in Anhui and Zhejiang. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2019, 42(5): 992–999. (in Chinese)
屈青松, 杨芳, 赵崇妍, 王婧茹, 曾金花, 史新元. 安徽和浙江蝉花内生细菌的分离及其多样性研究. *中药材*, 2019, 42(5): 992–999.
- [24] Yang P, van Elsas JD. Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. *Applied Soil Ecology*, 2018, 129: 112–120.
- [25] Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 869–885.
- [26] Mao YX, Tan RR, Wang YP, Chen X, Wang HJ, Huang DJ, Gong ZM. Analysis of the bacterial diversity in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* based on 16S rDNA sequences. *Plant Protection*, 2018, 44(3): 17–23, 48. (in Chinese)
毛迎新, 谭荣荣, 王友平, 陈勋, 王红娟, 黄丹娟, 龚自明. 基于 16S rDNA 序列的小贯小绿叶蝉共生细菌多样性研究. *植物保护*, 2018, 44(3): 17–23, 48.
- [27] Zhao F, Li CB. Characteristics of intestinal bacterium *Akkermansia muciniphila* and the association with host health. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 1458–1463. (in Chinese)
赵凡, 李春保. 肠道菌 *Akkermansia muciniphila* 的特性及其与机体健康的关系. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1458–1463.
- [28] Wang XZ, Xie JP, Wang HH. The characteristics of *Mycobacterial* genome and habitat adaptation and main host models. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(9): 911–915. (in Chinese)
王晓珍, 谢建平, 王洪海. 分枝杆菌基因组与生境适应的特征及主要宿主模型. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(9): 911–915.
- [29] Zhang DZ, Wen JY, Zhou WC, Wu XY. Hospital infection and multidrug resistance of *Flavobacterium*: characteristics and analysis. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2009, 19(15): 2040–2043. (in Chinese)
张德忠, 温建艳, 周文聪, 吴晓燕. 黄杆菌属医院感染特性与多药耐药分析. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(15): 2040–2043.

Bacterial community structure and function of *Cordyceps cicadae* microecosystem in Guiyang

Dan Mou¹, Zhaoying Zeng¹, Wenlin Zhong¹, Jiayi Zhou¹, Jiaojiao Qu², Xiao Zou^{1*}

¹ Institute of Fungus Resources, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

² College of Tea Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Abstract: [Objective] To explore the structure, function and relationship of bacterial community in sclerotia, cortices and habitat soil of *Cordyceps cicadae* under the natural ecology. [Methods] High-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA amplification fragments was performed to analyze the composition, diversity and potential functions of bacterial community in sclerotia, cortices and habitat soil of *Cordyceps cicadae* in Mount Dajiang and Guiyang Forest Park. [Results] A total of 562 bacterial genera were detected in the sclerotia samples, 521 genera were detected in the cortices samples, and 578 genera were detected in the hyphosphere soil samples. The bacterial community structure of each group of samples from the two places was similar. In the sclerotia samples, *Pseudomonas* and *Sphingobacterium* were the dominant populations. *Pseudomonas* and *Aminobacter* were the dominant populations in the cortices samples. The norank_c_Acidobacteria and norank_f_Xanthobacteraceae were the dominant genera in the soil samples. Venn analysis showed that the hyphosphere soil samples included most genera of the cortices samples, and the sclerotia samples had more endemic genera, such as *Wolbachia* and *Rickettsia*. Furthermore, the PICRUSt function prediction results showed that there are a total of 24 gene function families, which are mainly related to the metabolism and transportation of material and energy, as well as the occurrence and regulation of cell behavior. [Conclusion] Bacteria in the *Cordyceps cicadae* and its microhabitat had rich diversity. Their potential function may be related to the metabolism of nutrients and played important roles in the individual growth and development of the *Cordyceps cicadae*. The results have reference value for supplementing the ecological information data of *Cordyceps cicadae* and imitating wild cultivation.

Keywords: *Cordyceps cicadae*, bacterial community, high-throughput sequencing, PICRUSt

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860037) and by the Guizhou Provincial Department of Science and Technology Project (Qiankehe Support [2019] 2405, Qiankehe Foundation [2020] 1Z009)

*Corresponding author. E-mail: xzou@gzu.edu.cn

Received: 19 August 2020; Revised: 29 September 2020; Published online: 5 November 2020