



# 彩虹锹甲不同发育阶段肠道真菌群落特征研究

宾小艳<sup>1,2</sup>, 王苗苗<sup>1,2</sup>, 李晓璐<sup>1,2</sup>, 项兴佳<sup>1,2\*</sup>, 万霞<sup>1,2\*</sup>

1 安徽大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽省湿地生态保护与恢复重点实验室, 安徽 合肥 230601

宾小艳, 王苗苗, 李晓璐, 项兴佳, 万霞. 彩虹锹甲不同发育阶段肠道真菌群落特征研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2728-2742.

BIN Xiaoyan, WANG Miaomiao, LI Xiaolu, XIANG Xingjia, WAN Xia. Characteristics of gut fungal community at different developmental stages of the rainbow stag beetle *Phalacrognathus muelleri* (Coleoptera: Lucanidae)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2728-2742.

**摘要:**【目的】肠道微生物中的真菌群落在宿主生命活动中具有多种功能。锹甲是常见的腐食性甲虫,但目前对其肠道真菌群落的研究较少,本研究分析彩虹锹甲(*Phalacrognathus muelleri*)不同发育阶段的肠道真菌群落结构和多样性,试图阐明彩虹锹甲在不同发育阶段中肠道真菌群落的特征。【方法】本研究通过高通量测序(Illumina MiSeq)技术对彩虹锹甲不同发育阶段(包括新生幼虫、成熟幼虫、成虫)之间肠道真菌群落结构进行比较研究,分析其 $\alpha$ 多样性、 $\beta$ 多样性和功能预测。【结果】彩虹锹甲肠道优势真菌类群为假丝酵母属(*Candida*)、*Phialocephala*、青霉属(*Penicillium*)、烧瓶状霉属(*Lecythophora*)。肠道真菌群落组成与多样性在幼虫期和成虫期存在显著差异,成虫与幼虫食性差别可能是导致肠道真菌群落组成和多样性差异的重要原因。功能预测结果显示,幼虫肠道中含有更高的内共生菌多样性与相对丰度,说明幼虫可能更加依赖其肠道有益真菌来获得充分的养分。 $\beta$ 零模型结果显示,成虫肠道对其真菌群落具有更强的过滤作用,从而选择特定的肠道真菌类群,导致成虫肠道真菌群落共现网络具有更高的稳定性,增强成虫对环境波动的适应能力。【结论】本研究发现彩虹锹甲不同发育阶段参与食物降解的功能真菌类型不同,幼虫可能对肠道真菌的依赖性更强,而成虫肠道较强的选择作用有助于选择特定真菌类群和保持肠道真菌群落稳定。本研究有助于更好理解锹甲肠道真菌群落的多样性,为开展腐栖甲虫作为生态系统重要功能群的利用与保护提供更多理论参考。

**关键词:** 腐栖甲虫; 彩虹锹甲; 肠道真菌群落; 高通量测序; 发育阶段

资助项目: 国家自然科学基金(31872276, 31801989)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872276, 31801989).

\*Corresponding authors. E-mail: XIANG Xingjia, xjxiang@ahu.edu.cn; WAN Xia, wanxia@ahu.edu.cn

Received: 2022-10-19; Accepted: 2023-01-18; Published online: 2023-02-13

# Characteristics of gut fungal community at different developmental stages of the rainbow stag beetle *Phalacrognathus muelleri* (Coleoptera: Lucanidae)

BIN Xiaoyan<sup>1,2</sup>, WANG Miaomiao<sup>1,2</sup>, LI Xiaolu<sup>1,2</sup>, XIANG Xingjia<sup>1,2\*</sup>, WAN Xia<sup>1,2\*</sup>

1 School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Anhui Province Key Laboratory of Wetland Ecosystem Protection and Restoration, Hefei 230601, Anhui, China

**Abstract: [Objective]** Gut fungal microorganisms play multiple roles in the life history of their hosts as indispensable part of gut microbiota. Although stag beetles are common saprophytic insects, little is known about their gut fungal community. In this study, we compared the structure and diversity of gut fungi at different developmental stages of the rainbow stag beetle, *Phalacrognathus muelleri*, aiming to reveal the characteristics of the fungi at different developmental stages of this insect. **[Methods]** We employed high-throughput sequencing (Illumina MiSeq) to study the gut fungal community structure in the newborn larvae, mature larvae, and adults of *P. muelleri*. Further, we analyzed alpha and beta diversity and carried out functional prediction for the fungi. **[Results]** The predominant fungal genera in the gut of *P. muelleri* were *Candida*, *Phialocephala*, *Penicillium*, and *Lecythophora*. The composition and diversity of the gut fungal community were significantly different between the larvae and adults, which may be associated with their different diets. The functional prediction showed that endosymbiotic fungi in the larval gut had higher diversity and relative abundance, suggesting that the larvae might depend more on the beneficial fungal taxa in the gut to obtain nutrients. The results of the abundance-based  $\beta$ -null deviation showed that the adult gut exerted a stronger filtering effect to select specific fungal taxa. Thus, the adults might build a more stable co-occurrence network of gut fungal community which supported them to adapt to the environmental fluctuations. **[Conclusion]** Different groups of functional fungi are involved in the food degradation of *P. muelleri* at different developmental stages. The larvae may depend more on gut fungi, and the adult gut has strong filtering effect to select specific groups of fungi and maintain the stability of the gut fungal community. Our study enhances our understanding of the gut microbiota of stag beetles, which can aid in the conservation and utilization of these saprophytic beetles as an important functional group in ecosystems.

**Keywords:** saprophytic insect; *Phalacrognathus muelleri*; gut fungal community; Illumina MiSeq; developmental stages

昆虫是动物界种类多、数量大、分布广和生态习性多样的一个类群，有复杂且高度专业化的肠道系统，其聚集大量微生物群落，利于昆虫适应各种环境和食物资源<sup>[1-2]</sup>。研究表明，昆虫肠道微生物在宿主中具有重要的生理功

能，如提供不均衡饮食所缺少的必需营养成分，调节新陈代谢，提高对食物养分的吸收效率。此外肠道微生物还具有解毒、增强免疫等功能，可使宿主免受潜在有害微生物的侵害<sup>[2]</sup>。肠道菌群可以分为驻留菌群和过路菌群，前者可在

宿主肠道特定位置定殖, 增殖更新速度等于或大于损失速度, 而且其种类会因食性不同而发生变化; 后者在宿主肠道内停留较短, 并随着食物残渣排出体外, 易受到外界环境的影响<sup>[3]</sup>。

甲虫肠道微生物的研究关注对农林作物有危害的甲虫如小蠹<sup>[4]</sup>、天牛<sup>[5]</sup>等, 以期通过对肠道微生物的干扰来促进害虫的死亡, 达到生物防治的目的; 同时也对一些具有特殊食性的甲虫如葬甲<sup>[6]</sup>、蜣螂<sup>[7]</sup>等的肠道细菌进行深入探索, 旨在理解其肠道微生物与特有食物分解与营养吸收的关系。Salem & Kaltentpoth 对甲虫肠道细菌的研究进行了系统的总结与回顾<sup>[8]</sup>。

锹甲 (*Lucanidae*) 隶属于鞘翅目 (*Coleoptera*) 金龟总科 (*Scarabaeoidea*), 其大多具有鲜艳色彩的金属光泽, 且雄性具有长而弯曲、形似鹿角的上颚, 具有较高的观赏价值, 深受昆虫爱好者的喜爱<sup>[9]</sup>。大多数锹甲栖息于热带和亚热带森林, 对栖息地的温度、湿度变化、人为干扰程度等响应敏感, 可作为森林生态系统指示物种<sup>[10]</sup>。在自然环境下, 锹甲幼虫主要以朽木为食, 成虫以花蜜或树汁为食, 并在森林生态系统的碳氮循环中占据独特的生态位<sup>[11]</sup>。目前, 有关锹甲科的肠道微生物主要涉及从个别属或种肠道内分离出酵母菌、细菌等<sup>[12-13]</sup>。尽管高通量测序技术已广泛用于多种昆虫的肠道微生物群落研究, 将其应用于探索锹甲肠道微生物的研究还较少。截止目前, 主要开展了对锹甲肠道细菌群落的研究, 如对华美奥锹甲成虫的野外种群研究发现, 肠道细菌的多样性和组成在不同大小及颚型的雄性间、雌雄之间存在差异<sup>[14]</sup>, 人工饲养条件下不同发育阶段彩虹锹甲的细菌群落多样性也存在显著不同<sup>[15]</sup>, 但关于锹甲肠道真菌群落的研究鲜有报道<sup>[16]</sup>。锹甲幼虫多以木屑为食物, 真菌与木质素降解间关系密切, 从而推测锹甲肠道内真菌群落对食物消化和养分吸收起到主要

作用, 值得深入研究, 以期将肠道真菌群落作为工具, 应用于生物质废弃物的降解、回收和循环利用等。

彩虹锹甲不仅是对森林生态系统健康维持有益的腐栖甲虫, 也因绚丽的体色和奇特的外形而成为著名观赏昆虫及宠物, 具有较高的商业价值, 目前已在全球多个国家进行人工饲养。在室内恒温条件下利用发酵木屑和果冻即可进行人工饲养。本研究选取人工饲养条件下不同发育阶段(新生幼虫、成熟幼虫、成虫)和不同性别(雌虫和雄虫)的彩虹锹甲作为研究对象, 通过高通量测序技术研究肠道真菌群落组成和多样性, 并探讨其在彩虹锹甲生长发育中的潜在作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样本采集和饲养条件

本研究使用的不同发育阶段彩虹锹甲样本来自牧野虫社公司(浙江省丽水县), 在恒温(22 °C)条件下进行彩虹锹甲饲养, 新生幼虫及成熟幼虫生活在含有 50%水分发酵木屑(VINOX 维式甲虫初级发酵木屑, 5 L/包, 主要成分: 蒙古栎、发酸菌、动植物蛋白等)的饲养盒中, 并以发酵木屑为食, 通过定期观察彩虹锹甲摄食情况, 进行食物更换和补充水分。成虫生活在含有 50%水分生木屑垫料的饲养盒中, 饲喂果冻(YUE-享栎甲虫专用果冻, 25 颗/包, 主要成分为琼脂、多种糖类、维生素等), 定期更换饲料和垫料, 在每个发育阶段后的第 10 天进行取样。从牧野虫社公司采集彩虹锹甲后立即进行解剖。样本总数共有 42 头, 分别是新生幼虫 9 个重复; 成熟幼虫 18 个重复, 含雌虫 9 个重复和雄虫 9 个重复; 成虫 15 个重复, 含雌虫 10 个重复和雄虫 5 个重复。彩虹锹甲幼虫的雌雄发育在成熟幼虫阶段可以通过头宽和体重来区分<sup>[17]</sup>。雌幼虫的头部宽度小于雄幼虫。雌幼虫头部宽度约 7–9 mm,

雄幼虫可达 11–12 mm; 雌幼虫的重量也比雄幼虫轻。雌幼虫重 8–12 g, 雄幼虫重 14–22 g。在成虫阶段的雌雄鉴定主要是通过上颚发育的大小来区分, 雄成虫的上颚较雌成虫显著发达。

## 1.2 样品解剖和肠道 DNA 提取

以下操作均在超净工作台内进行, 解剖前将样品用 70%乙醇浸泡 3 min, 再用无菌水冲洗 2 遍, 然后将虫体浸泡在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(500 mL, NaCl 1.37 mol/L, KCl 26.8 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81.0 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17.6 mmol/L, pH 7.2–7.4)<sup>[18]</sup>, 在解剖显微镜(OLYMPUS)下对样本进行解剖取出中后肠并除去肠道内容物<sup>[19]</sup>。使用 QIAamp FAST DNA Stool Mini Kits 试剂盒(Qiagen)提取肠道样品 DNA, 并将其储存于 -20 °C 冰箱中用于后续操作。

## 1.3 PCR 扩增和测序

以肠道样品 DNA 作为模板, 使用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')<sup>[20]</sup> 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')<sup>[21]</sup> 对真菌 ITS 片段进行 PCR 扩增。反应体系为 20 μL: 2 μL 10×Buffer 缓冲液; 2 μL 2.5 mmol/L 脱氧核苷酸(dNTPs); ITS1F 和 ITS2R 各 0.8 μL; 0.2 μL DNA 聚合酶; 0.2 μL 牛血清白蛋白; 10 ng 模板 DNA; 去离子纯水补至 20 μL。扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 27 个循环; 最后 72 °C 10 min。每个样品做 3 次 PCR 扩增后混匀。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增合格的 PCR 产物送往上海美吉生物公司测序。

## 1.4 生物信息学分析

原始数据用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME Version 1.9)软件<sup>[22]</sup>处理和分析, 删除低质量(q 值低于 30)和较短序列(短于 250 bp), 并使用 USEARCH (Version 1.8.0)去除嵌合体, 用 UCLUST 通过 97%相似度进行聚类获得操作分类单元(operational taxonomic units,

OTU), 每个操作分类单元中丰度最高的序列被选为代表序列, 代表序列使用 UNITE 数据库 (Version 8.0) (<http://unite.ut.ee>)进行注释和分类<sup>[23]</sup>。

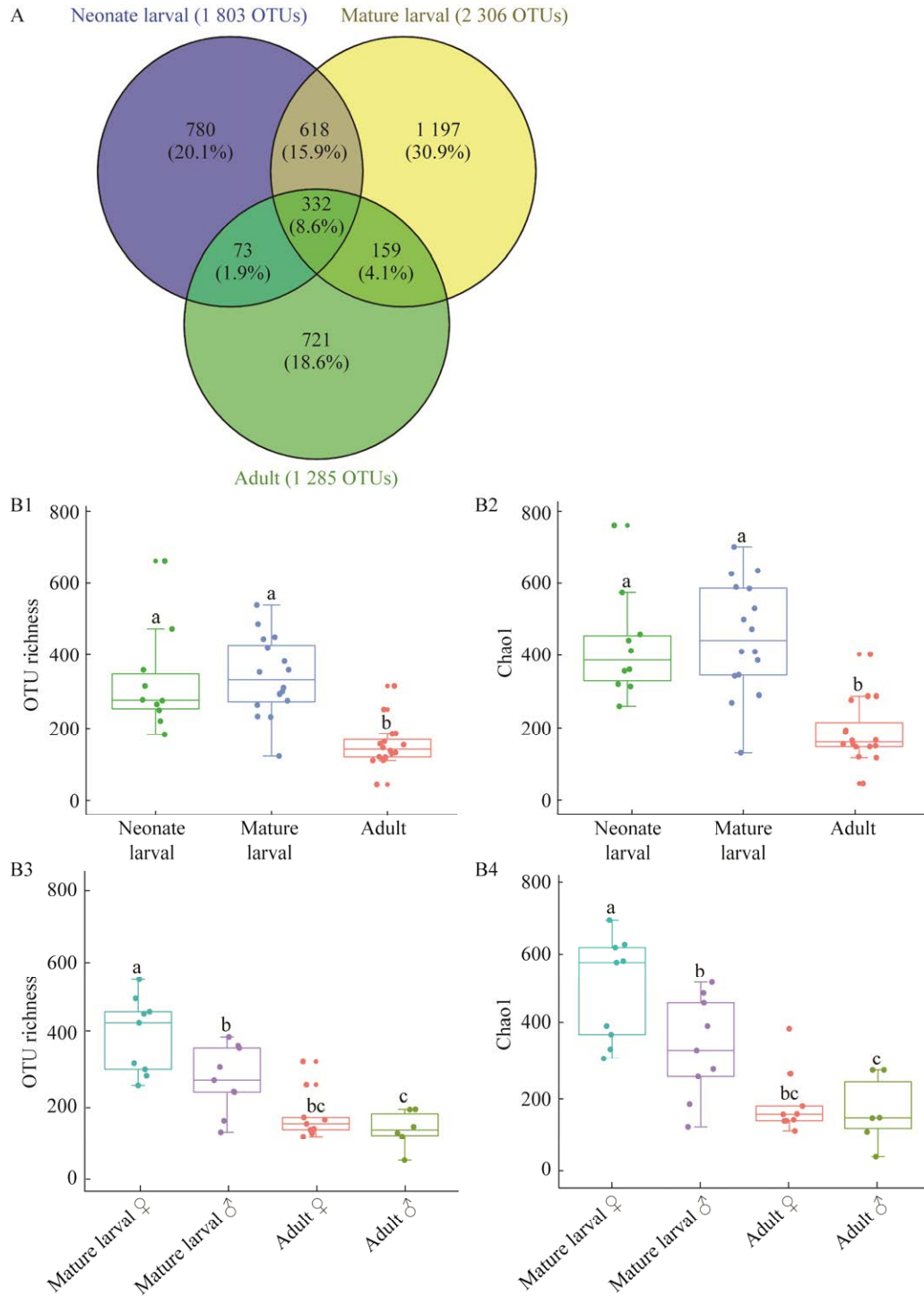
## 1.5 统计分析

采用 SPSS 软件(Version 20)单因素方差分析比较不同处理中真菌优势属的相对丰度和  $\alpha$  多样性差异<sup>[24]</sup>。使用 R 软件(Version 4.1.3)的 vegan 包进行非度量多维度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)和相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM; permutations=999)<sup>[25]</sup>。通过线性判别分析(LDA effect size)揭示不同发育阶段肠道真菌标志物<sup>[26]</sup>。使用 R 软件(Version 4.1.3)的 labdsv 包进行指示物种分析, 揭示不同发育阶段富集的真菌种类<sup>[25]</sup>。利用 vegan 包进行 SIMPER 分析, 揭示引起不同发育阶段肠道真菌群落差异的真菌类群<sup>[27]</sup>。采用 FUNGuild 方法进行真菌功能预测分析, 具有高置信度(即极大可能和可能)的功能预测结果进行后续分析<sup>[28]</sup>, 使用 R 软件(Version 4.1.3)中的 dplyr、igraph 和 Hmisc 包构建肠道真菌共现网络, 并用 Gephi 软件(Version 0.9.2)进行可视化<sup>[29]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠道真菌 $\alpha$ 多样性

在所有样品中共获得 2 505 932 条高质量的真菌序列, 每个样本的序列从 33 877–70 245 不等。总共发现 5 394 种真菌 OTU (相似性>97%), 所有样品的 OTU 数范围为 44–668 不等。其中 332 (8.6%)个真菌 OTU 在不同发育阶段中都能检测到。新生幼虫、成熟幼虫和成虫的特有肠道真菌 OTU 分别为 780 个(20.1%)、1 197 个(30.9%)和 721 个(18.6%) (图 1A)。对彩虹锹甲的不同发育阶段和不同性别肠道真菌的  $\alpha$  多样性(OTU richness、Chao1)进行分析, 结果表明, 成熟幼虫的  $\alpha$  多样性(OTU richness、Chao1)显著高于成虫(图 1B1、B2)。不同性别之间, 雌



**图 1** 不同发育阶段肠道真菌操作分类单元(OTU)的重叠度(A)及  $\alpha$  多样性的比较(B)

Figure 1 The overlapping of intestinal fungal operational taxonomic units (OTU) (A) and fungal alpha diversity at different developmental stages (B). B1: Comparison of OUT richness in different developmental stages; B2: Comparison of Chao1 index in different developmental stages; B3: Comparison of OUT richness in different sexes; B4: Comparison of Chao1 index in different sexes. Different letters above box plots indicate significant differences at 0.05 level.

雄成熟幼虫之间肠道真菌多样性差异显著, 而雌雄成虫之间无显著差异(图 1B3、B4)。

## 2.2 肠道真菌群落结构

彩虹锹甲的优势属主要是假丝酵母属(*Candida*) (16.01%)、*Phialocephala* (8.88%)、青霉属(*Penicillium*) (3.99%) 和烧瓶状霉属(*Lecythophora*) (3.25%)。新生幼虫阶段中 *Phialocephala* 和烧瓶状霉属(*Lecythophora*) 相对于成熟幼虫和成虫的相对丰度较高, 假丝酵母属(*Candida*) 在成虫阶段中相对丰度最高(图 2)。

非度量多维度分析(NMDS)和相似性分析(ANOSIM: permutations=999)揭示, 彩虹锹甲不同发育阶段和不同性别之间肠道真菌群落组成的差异。结果表明幼虫和成虫肠道真菌群落组成之间存在显著差异(ANOSIM:  $P=0.001$ ), 但新生幼

虫与成熟幼虫之间差异不显著(ANOSIM:  $P=0.063$ ) (图 3A)。成熟幼虫雌性和成熟幼虫雄性之间肠道真菌群落组成存在显著差异(ANOSIM:  $P=0.033$ ) (图 3B, 表 1), 但成虫雌性与成虫雄性之间无显著差异(ANOSIM:  $P=0.765$ ) (图 3B)。SIMPER 分析结果显示 *Candida sojae* 是引起幼虫与成虫之间肠道真菌群落组成差异的主要真菌种类(表 2)。基于丰度的  $\beta$  零模型(abundance-based beta-null deviation, NDV)结果显示, 彩虹锹甲幼虫发育过程中其肠道真菌群落构建随机过程性逐渐增强, 但是从成熟幼虫到成虫发育过程中确定性过程逐渐增强(图 4)。

利用线性判别(LDA effect size, LEfSe)分析不同发育阶段彩虹锹甲肠道真菌生物标志物, 结果表明在新生幼虫中富集真菌 2 个纲

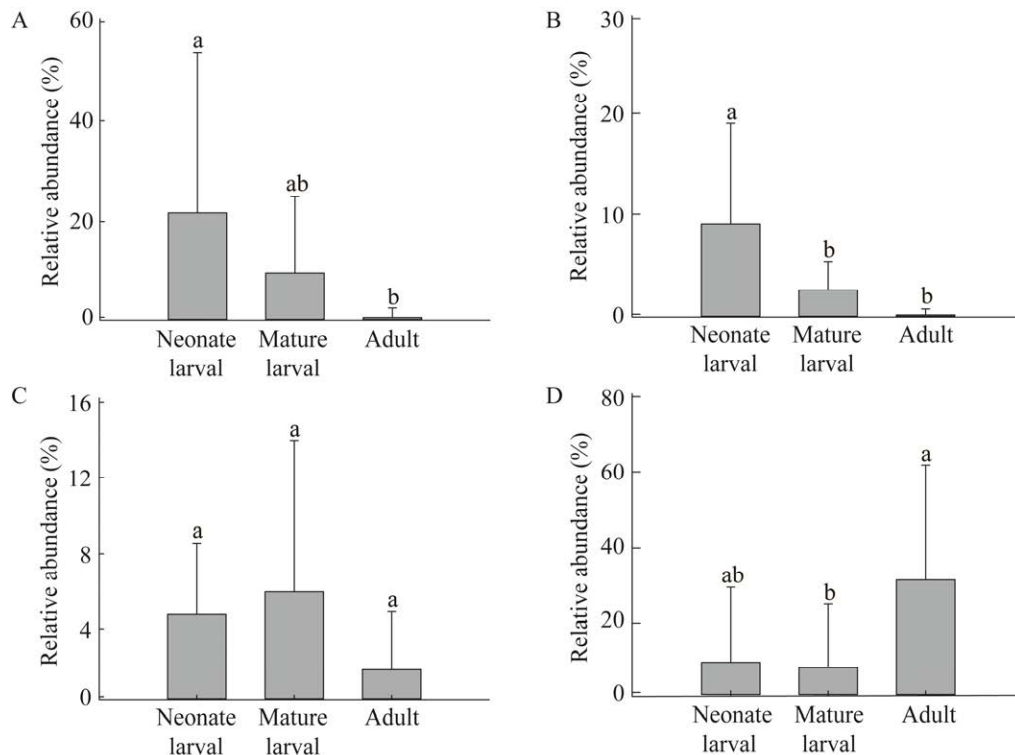


图 2 不同发育阶段肠道真菌优势属相对丰度的比较

Figure 2 The comparison of relative abundance of intestinal fungal dominant genera at different developmental stages. Different letters above bar plots indicate significant differences at 0.05 level. A: *Phialocephala*. B: *Lecythophora*. C: *Penicillium*. D: *Candida*.

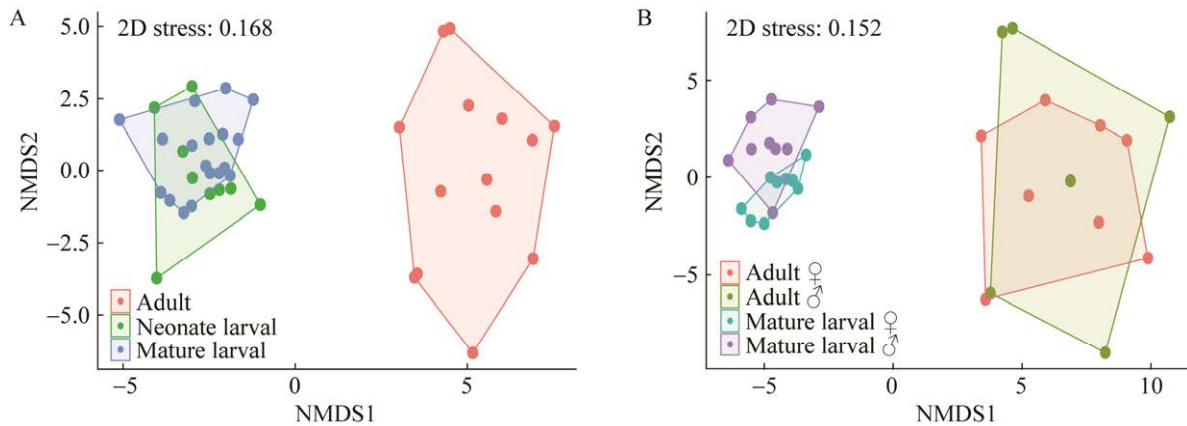


图 3 采用 NMDS 分析肠道真菌群落结构差异

Figure 3 The difference in intestinal fungal community structure were analyzed by NMDS. A: The intestinal fungal of different developmental stages community compositions. B: The intestinal fungal of different sexes community compositions.

表 1 采用相似分析比较不同发育阶段和不同性别之间肠道真菌群落组成的差异

Table 1 Comparison of the difference in intestinal fungal community composition among developmental stages and between different sexes using similarity analysis

Stages	ANOSIM	
	R	P
Neonate larval vs. mature larval	0.134	0.063
Neonate larval vs. adult	0.658	0.001
Mature larval vs. adult	0.741	0.001
Larval vs. adult	0.785	0.001
Mature larval ♀ vs. mature larval ♂	0.160	0.033
Adult ♀ vs. adult ♂	-0.082	0.765
Mature larval ♀ vs. adult ♀	0.667	0.001
Mature larval ♂ vs. adult ♂	0.816	0.001

表 2 不同发育阶段肠道真菌的 SIMPER 分析

Table 2 The SIMPER analysis for different developmental stages

Taxonomy	Contribution (%)		
	Neonate larval vs. mature larval	Neonate larval vs. adult	Mature larval vs. adult
s_ <i>Phialocephala humicola</i>	27.04	15.53	8.44
s_ <i>Candida sojae</i>	15.54	18.80	22.52
s_ <i>Lecythophora fasciculata</i>	10.99	7.48	–
s_ <i>Trichosporon veenhuisii</i>	5.67	–	–
s_ <i>Scedosporium prolificans</i>	4.84	–	–
s_ <i>Kazachstania exigua</i>	–	5.92	7.18
s_ <i>Williopsis californica</i> var. <i>dimennae</i>	–	4.94	6.48
s_ <i>Candida quercitrusa</i>	–	–	6.00

– indicates that the fungus is not present in the given group.

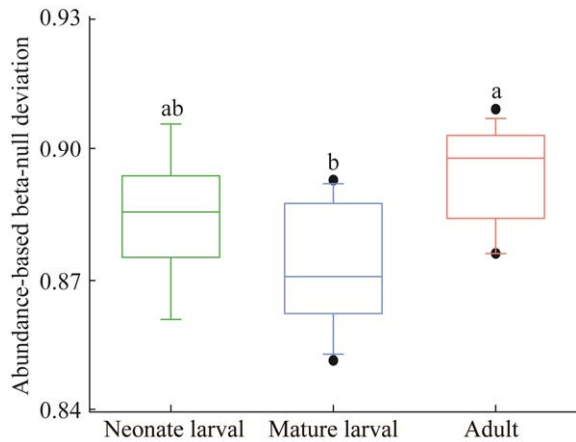


图 4 基于丰度  $\beta$  零偏差模型研究不同发育阶段肠道真菌群落的构建过程

Figure 4 The study of intestinal fungal community assembly process at different developmental stages using abundance-based beta-null deviation. Different letters above box plots indicate significant differences at 0.05 level.

[粪壳菌纲 (*Sordariomycetes*)、锤舌菌纲 (*Leotiomycetes*)], 2 个目[柔膜菌目 (*Helotiales*)、毛孢壳目 (*Coniochaetales*)]和 5 个科[水盘菌科 (*Vibrisseaceae*)、毛孢壳科 (*Coniochaetaceae*)、*Chaetomiaceae* 等]; 在成熟幼虫中富集真菌的 4 个目[煤炱目 (*Capnodiales*)、刺球壳目 (*Chaetosphaeriales*)、小囊菌目 (*Microascales*)等]和 4 个科[刺球壳科 (*Chaetosphaeriaceae*)、小囊菌科 (*Microascaceae*)、齿菌科 (*Hydnaceae*)等]; 在成虫中富集真菌 1 个纲 (*Saccharomycetes*)、5 个目[酵母菌目 (*Saccharomycetales*)、肉座菌目 (*Hypocreales*)、红菇目 (*Russulales*)等]和 7 个科[酵母科 (*Saccharomycetaceae*)、类酵母科 (*Saccharomycodaceae*)、皱皮菌科 (*Meruliaceae*)等] (图 5)。指示物种分析确定了新生幼虫、成熟幼

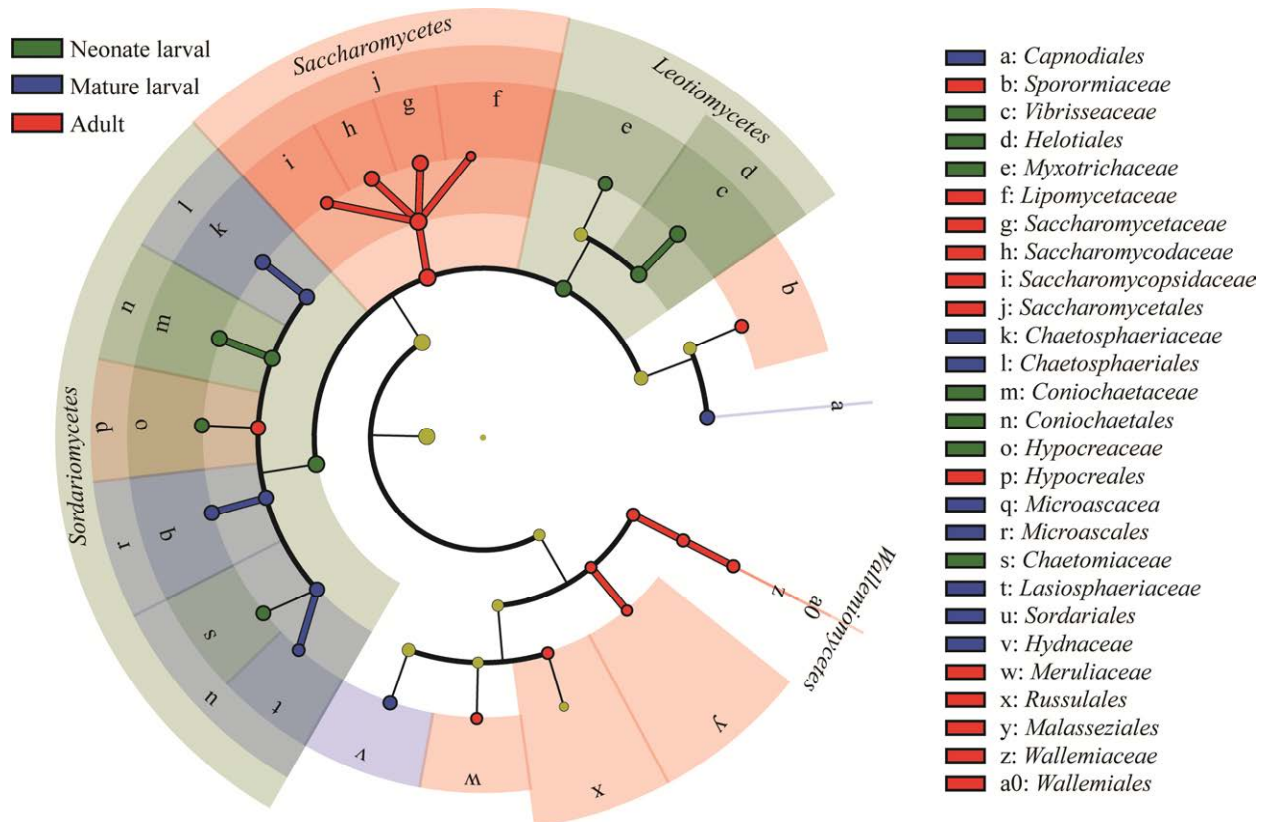


图 5 不同发育阶段肠道真菌的 LefSe 分析图

Figure 5 The LefSe analysis for intestinal fungi among different developmental stages.



虫和成虫中富集的真菌种类分别为 18 种 (*Phialocephala humicola*、*Lecytophora fasciculata*、*Coniochaeta gigantospora* 等)、10 种 (*Scedosporium prolificans*、*Penicillium spinulosum*、*Chloridium virescens* var. *chlamydosporum* 等) 和 20 种 [*Candida sojae*、*Kazachstania exigua*、桔假丝酵母 (*Candida quercitrusa*) 等] (表 3)。

### 2.3 肠道真菌群落共现网络分析

通过构建肠道真菌群落间的共现网络，可

阐明彩虹锹甲肠道微生物中真菌群落之间的微生物共现模式。总体而言，不同发育阶段中的网络连接节点大部分是子囊菌门(图 6A)。以自然连通性评价网络稳定性，与新生幼虫和成熟幼虫相比，成虫的网络稳定性最高(图 6B)。为描述节点间复杂的相互关系模式，对不同发育阶段的网络拓扑特征进行计算。以平均度的值表示网络复杂度，成虫肠道真菌网络复杂度(66.621)明显高于新生幼虫(55.933)和成熟幼虫(45.030; 表 4)。

表 3 不同发育阶段肠道真菌的指示物种

Table 3 Intestinal fungal indicator species in different developmental stages

Stage	Taxonomy	Relative abundance (%)	P value
Neonate larval	s_ <i>Phialocephala humicola</i>	16.504	0.032
	s_ <i>Lecytophora fasciculata</i>	5.930	0.001
	s_ <i>Coniochaeta gigantospora</i>	1.578	0.007
	s_ <i>Pseudogymnoascus roseus</i>	0.512	0.034
	s_ <i>Mortierella amoeboides</i>	0.279	0.042
	s_ <i>Penicillium abidjanum</i>	0.225	0.015
	s_ <i>Candida albicans</i>	0.087	0.026
	s_ <i>Arniium gigantosporum</i>	0.038	0.021
	s_ <i>Gymnopilus aeruginosus</i>	0.025	0.046
	s_ <i>Gibberella intricans</i>	0.024	0.018
	s_ <i>Mortierella parvispora</i>	0.012	0.018
	s_ <i>Acremonium alternatum</i>	0.010	0.006
	s_ <i>Dioszegia takashimae</i>	0.009	0.034
	s_ <i>Cyathus stercoreus</i>	0.007	0.033
	s_ <i>Humicola nigrescens</i>	0.006	0.034
	s_ <i>Pestalotiopsis rhododendri</i>	0.003	0.027
	s_ <i>Holtermannia corniformis</i>	0.001	0.047
	s_ <i>Penicillium adametzii</i>	0.001	0.042
	Mature larval	s_ <i>Scedosporium prolificans</i>	2.957
s_ <i>Penicillium spinulosum</i>		1.816	0.017
s_ <i>Chloridium virescens</i> var. <i>chlamydosporum</i>		1.101	0.005
s_ <i>Mycothermus thermophilus</i>		0.615	0.004
s_ <i>Westerdykella dispersa</i>		0.374	0.021
s_ <i>Penicillium bialowiezense</i>		0.127	0.002
s_ <i>Penicillium christenseniae</i>		0.028	0.007
s_ <i>Aspergillus caesiellus</i>		0.007	0.020
Adult	s_ <i>Acremonium polychromum</i>	0.001	0.041
	s_ <i>Candida sojae</i>	22.469	0.027
	s_ <i>Kazachstania exigua</i>	5.218	0.009

(待续)

(续表 3)

Stage	Taxonomy	Relative abundance (%)	P value
	s_ <i>Candida quercitrusa</i>	3.947	0.002
	s_ <i>Hanseniaspora thailandica</i>	3.579	0.005
	s_ <i>Williopsis californica</i> var. <i>dimennae</i>	3.389	0.001
	s_ <i>Candida tropicalis</i>	1.185	0.003
	s_ <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.693	0.001
	s_ <i>Candida boleticola</i>	0.664	0.001
	s_ <i>Vanrija humicola</i>	0.374	0.007
	s_ <i>Debaryomyces udanii</i>	0.372	0.003
	s_ <i>Torulaspora delbrueckii</i>	0.315	0.001
	s_ <i>Wallemia sebi</i>	0.149	0.011
	s_ <i>Capronia semi-immersa</i>	0.126	0.017
	s_ <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.092	0.028
	s_ <i>Candida maltosa</i>	0.032	0.030
	s_ <i>Malassezia restricta</i>	0.014	0.017
	s_ <i>Saccharomycopsis schoenii</i>	0.012	0.007
	s_ <i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	0.009	0.002
	s_ <i>Candida salmanticensis</i>	0.005	0.050
	s_ <i>Lipomyces starkeyi</i>	0.002	0.041

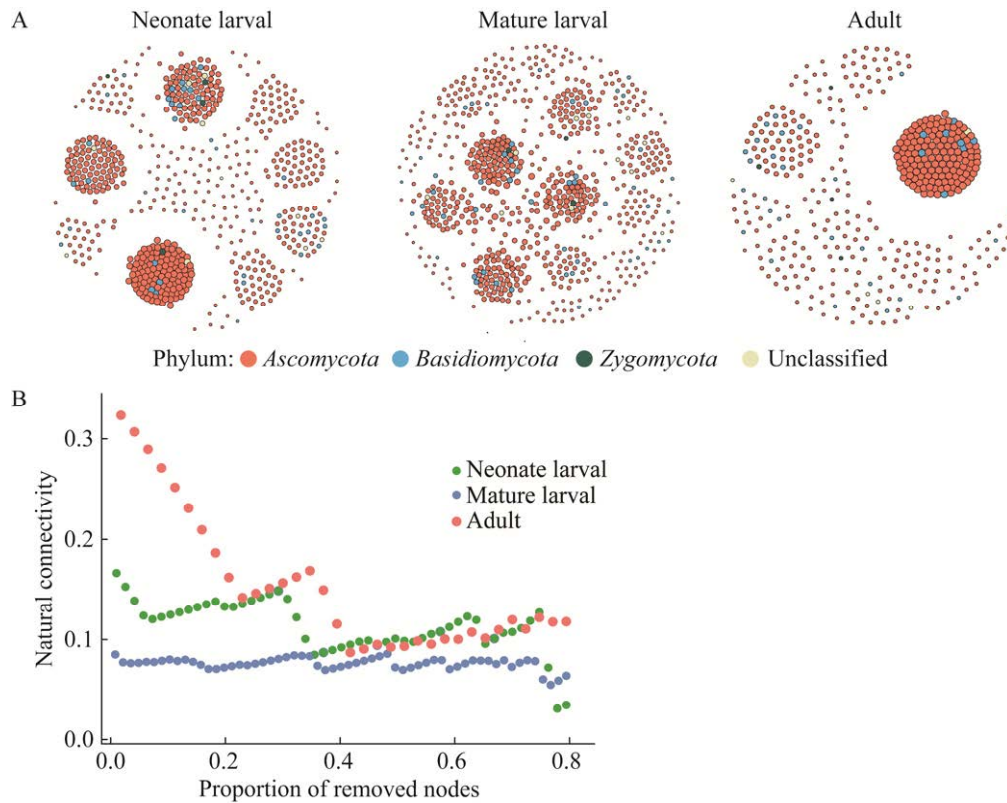


图 6 不同发育阶段肠道真菌共现网络结构(A)和自然连通度(B)分析

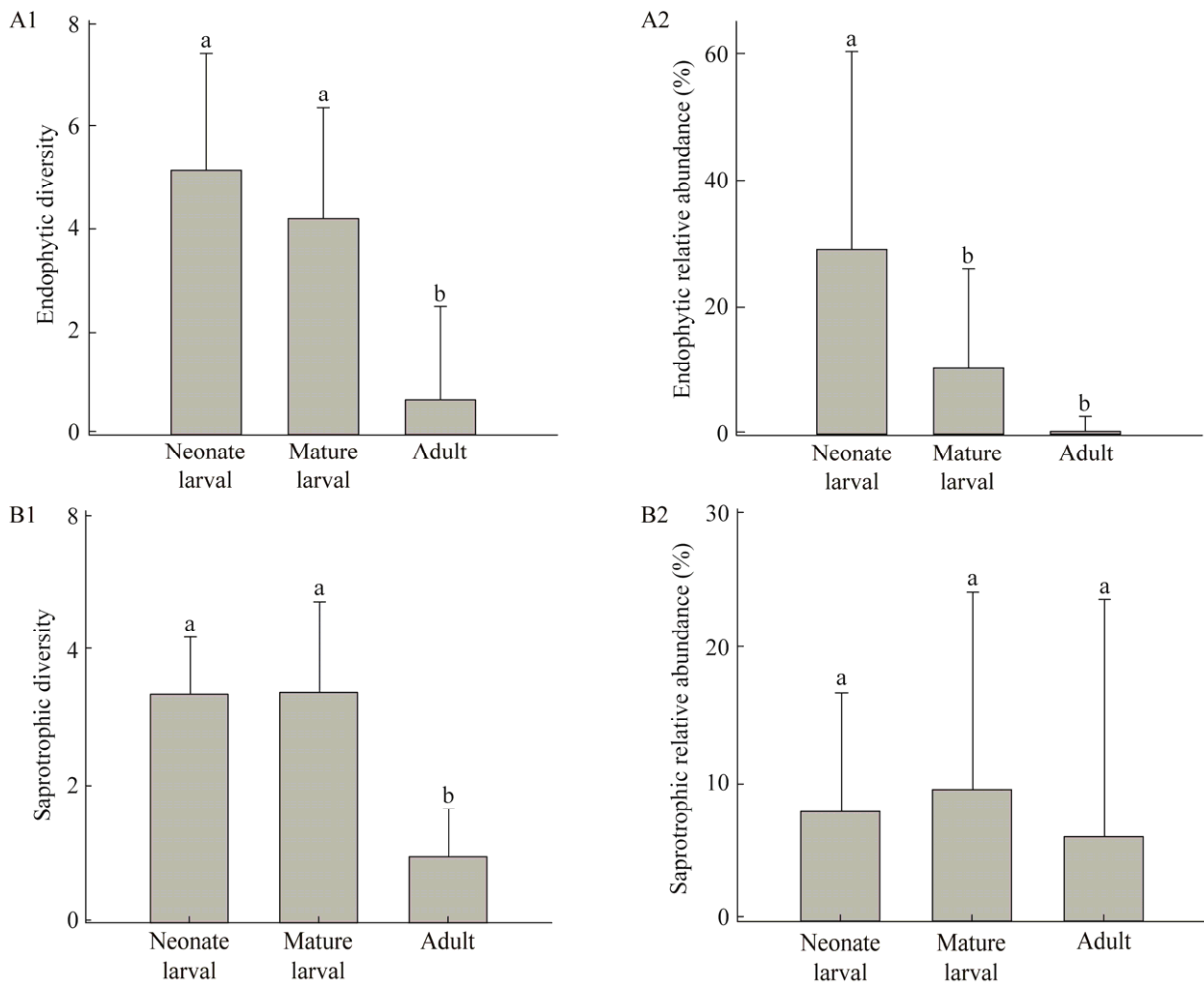
Figure 6 The analysis of intestinal fungal co-occurrence network structure (A) and natural connectivity (B) at different developmental stages.

**表 4** 不同发育阶段肠道真菌共现网络拓扑特征  
**Table 4** Topological characteristics of intestinal fungal co-occurrence network at different developmental stages

Network properties	Group		
	Neonate larval	Mature larval	Adult
Average degree	55.93	45.03	66.62
Graph density	0.09	0.062	0.16
Clustering coefficient	0.96	0.79	0.99
Average weighted degree	107.82	75.79	127.47

## 2.4 肠道真菌群落功能预测

采用 FUNGuild 分析对彩虹锹甲不同发育阶段的腐生菌和内共生菌的丰度和多样性进行推断。新生幼虫的内共生菌多样性和相对丰度最高,而成虫的内共生菌多样性和相对丰度最低(图 7A1、A2)。幼虫肠道中的腐生菌多样性显著高于成虫(图 7B1),但幼虫和成虫腐生菌相对丰度无显著差异(图 7B2)。



**图 7** 采用 FUNGuild 预测不同发育阶段肠道真菌功能

**Figure 7** Functional prediction of the intestinal fungi at different developmental stages using FUNGuild. A: Endophytes. A1: The endophytic diversity; A2: The relative abundance of endophytic. B: Saprotrophs. B1: The saprotrophic diversity; B2: The relative abundance of saprotrophic. Different letters above bar plots indicate significant differences at 0.05 level.

### 3 讨论

已有研究证实食性是影响宿主肠道微生物群落变化的主要驱动力之一<sup>[30-31]</sup>。本研究中彩虹锹甲在幼虫期以发酵木屑作为食物, 而成虫期以果冻为食, 不同食性是导致肠道微生物群落差异的重要因素(图 3A), 该结果与前人研究一致<sup>[15]</sup>。本研究发现新生幼虫与成熟幼虫肠道真菌群落差异不显著, 主要原因可能也是新生幼虫和成熟幼虫食性相似。此外, 完全变态类昆虫在蛹期蜕变成成虫期时, 变态过程会剧烈重塑肠道和其他器官, 严重影响肠道微生物群落的附着<sup>[2]</sup>, 这可能也是导致彩虹锹甲幼虫与成虫肠道真菌群落组成差异的原因之一。

在以发酵木屑为食的幼虫期肠道中发现 *Phialocephala*、*Lecythophora*、*Penicillium* 处于优势地位(图 2), 其中 *Lecythophora* 可降解木质素和纤维素<sup>[32]</sup>, *Penicillium* 具有降解木质纤维素物质的酶, 如木质素过氧化物酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶等<sup>[33]</sup>; 而在以果冻为食的成虫期肠道中, 具有降解脂蛋白质和发酵木糖功能的 *Candida*<sup>[34]</sup> 相对丰度显著上升。彩虹锹甲幼虫期和成虫期可能因不同食物种类而导致其肠道中真菌优势菌属差异, 进而引起肠道功能真菌类型产生差异。总体而言, 不同发育时期富集的特定真菌可以帮助彩虹锹甲在不同发育阶段获得更多可利用的营养物质, 为其发育提供必要的营养和能量, 保证其生长发育和繁殖。

采用 FUNGuild 功能预测分析发现幼虫较成虫肠道中含有更高内共生菌的多样性和相对丰度(图 7A1、A2)。大量研究表明昆虫内共生菌是昆虫的有益菌<sup>[35-36]</sup>, 昆虫肠道内共生菌可为宿主提供营养, 如必需的氨基酸、维生素<sup>[37-38]</sup>等; 此外内共生菌还可以帮助宿主降解木质纤维素

等高分子结构化合物、合成营养物质等<sup>[39]</sup>。由于幼虫取食木屑, 而成虫取食果冻。与木屑相比, 果冻主要为黑糖, 成分简单且易消化。相比较于成虫, 幼虫肠道真菌可能对辅助宿主食物消化具有更重要的作用, 进而幼虫肠道中具有更高的内共生真菌的多样性和相对丰度(图 7A1、A2)。

彩虹锹甲肠道真菌的多样性随着不同发育阶段先上升后下降, 这与已有研究结果一致<sup>[40]</sup>。可能是因成熟幼虫期正是快速生长发育阶段, 需要从食物中获取更多的营养准备蛹期发育, 进而摄食量变大, 而成虫刚经羽化阶段后, 进食很少。此外, 幼虫与成虫的食物种类不同, 其中发酵木屑的微生物群落多样性高于果冻。因此以上原因可能导致成熟幼虫期肠道有大量微生物定殖, 具有较高的真菌多样性。前人报道证明肠道微生物群落构建受随机性过程或确定性过程控制<sup>[41]</sup>。肠道可看作微生物群落的“岛屿”, 具有选择外来微生物功能, 组建独特的微生物群落<sup>[42-43]</sup>。本研究采用 NDV 对肠道真菌群落构建进行研究, 发现成虫肠道真菌 NDV 值高于幼虫(图 4)。NDV 越高说明确定性过程越强, 肠道具有更强选择性<sup>[44]</sup>。肠道选择作用是影响微生物群落组成和多样性的重要因素之一<sup>[45]</sup>, 它不仅会选择特定的肠道微生物类群而且可以排除其中某些类群, 从而引起微生物群落组成改变和多样性的下降。因此, 与幼虫相比, 成虫肠道选择作用的增强可能是导致彩虹锹甲成虫肠道真菌群落组成改变和多样性下降的一个重要原因(图 1B1、B2)。

进一步采用网络分析发现成虫期彩虹锹甲肠道真菌的共现网络具有更高的稳定性, 且平均度和聚集系数最大(图 6B, 表 4)。研究表明, 高稳定性的微生物网络结构可能对环境波动有更强的抵抗力<sup>[46]</sup>, 较高的网络平均度有利于肠

道微生物群落之间的物质代谢和信息交换, 增强微生物之间的协作能力。与彩虹锹甲幼虫相比, 成虫更能适应不同环境, 并且对外界不利环境的抵抗力更强。因此, 彩虹锹甲在发育过程中肠道真菌群落构建发生改变, 成虫通过增强肠道选择作用对真菌定殖进行选择, 进而获得稳定的肠道真菌群落。

## 4 结论

本研究揭示了彩虹锹甲不同发育阶段对肠道真菌群落组成和多样性的影响, 发现不同发育阶段显著影响肠道真菌群落的组成和多样性。彩虹锹甲不同发育阶段食性不同, 导致参与食物降解的功能真菌类型不同。幼虫较成虫可能更加依赖肠道真菌获得更多可利用的营养物质。成虫肠道较强的选择作用对于选择特定真菌类群和保持肠道真菌群落稳定具有重要作用。本研究结果有助于更好地了解肠道微生物在宿主生长发育中的潜在作用, 可为从微生物角度开展腐栖甲虫的利用与保护提供理论支持。在今后的研究中, 需对食物中的真菌组成进行分析以进一步探究食物真菌对肠道真菌群落组成的影响, 并补充彩虹锹甲发育过程中的蛹期、成虫性成熟后的样本研究; 另外, 还要考虑对锹甲肠道的驻留菌群和过路菌群进行区分, 探讨它们对锹甲生长发育的影响。

## 致谢

感谢安徽大学方泽民教授在研究最初提出意见和建议, 感谢安徽大学硕士研究生朱雪利师姐、周利阳师兄及申亚钢、晏蒙、吴远诺、赵竞茹同学在数据分析过程中的帮助, 最后也感谢牧野虫社黄赛先生在采样时给予的支持与帮助。

## 参考文献

- [1] DAR MA, SHAIKH AF, PAWAR KD, XIE RR, SUN JZ, KANDASAMY S, PANDIT RS. Evaluation of cellulose degrading bacteria isolated from the gut-system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their potential values in biomass conversion[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11254.
- [2] ENGEL P, MORAN NA. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 699-735.
- [3] 周帆, 庞志倡, 余小强, 汪肖云. 昆虫肠道微生物的研究进展和应用前景[J]. *应用昆虫学报*, 2020, 57(3): 600-607.  
ZHOU F, PANG ZC, YU XQ, WANG XY. Insect gut microbiota research: progress and applications[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57(3): 600-607 (in Chinese).
- [4] HU X, LI M, RAFFA KF, LUO QY, FU HJ, WU SQ, LIANG GH, WANG R, ZHANG FP. Bacterial communities associated with the pine wilt disease vector *Monochamus alternatus* (*Coleoptera: Cerambycidae*) during different larval instars[J]. *Journal of Insect Science*, 2017, 17(6): 115.
- [5] SOTO-ROBLES LV, TORRES-BANDA V, RIVERA-ORDUÑA FN, CURIEL-QUESADA E, HIDALGO-LARA ME, ZÚÑIGA G. An overview of genes from *Cyberlindnera americana*, a symbiont yeast isolated from the gut of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* (*Curculionidae: scolytinae*), involved in the detoxification process using genome and transcriptome data[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2180.
- [6] WANG Y, ROZEN DE. Gut microbiota in the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*, provide colonization resistance against larval bacterial pathogens[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(3): 1646-1654.
- [7] EBERT KM, ARNOLD WG, EBERT PR, MERRITT DJ. Hindgut microbiota reflects different digestive strategies in dung beetles (*Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae*)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(5): e02100-20.
- [8] SALEM H, KALTENPOTH M. Beetle-bacterial symbioses: endless forms most functional[J]. *Annual Review of Entomology*, 2022, 67: 201-219.
- [9] 万霞, 杨星科. “锹甲”名称的由来及中国锹甲属的中名问题[J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 418-422, 433.  
WAN X, YANG XK. Chinese names of “*Lucanidae*”

- and genera from China[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2006, 43(3): 418-422, 433 (in Chinese).
- [10] HARVEY DJ, GANGE AC, HAWES CJ, RINK M. Bionomics and distribution of the stag beetle, *Lucanus cervus* (L.) across Europe[J]. Insect Conservation and Diversity, 2011, 4(1): 23-38.
- [11] TANAHASHI M, KUBOTA K. Utilization of the nutrients in the soluble and insoluble fractions of fungal mycelium by larvae of the stag beetle, *Dorcus rectus* (Coleoptera: Lucanidae)[J]. European Journal of Entomology, 2013, 110(4): 611-615.
- [12] UEKI G, ZHANG SN, ZHU XUEJ, WEN XJ, TOJO K, KUBOTA K. Lateral transmission of yeast symbionts among lucanid beetle taxa[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 794904.
- [13] MIYASHITA A, HIRAI Y, SEKIMIZU K, KAITO C. Antibiotic-producing bacteria from stag beetle mycangia[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2015; 9(1): 33-37.
- [14] WAN X, JIANG Y, CAO YY, SUN BH, XIANG XJ. Divergence in gut bacterial community structure between male and female stag beetles *Odontolabis fallaciosa* (Coleoptera, Lucanidae)[J]. Animals, 2020, 10(12): 2352.
- [15] WANG MM, XIANG XJ, WAN X. Divergence in gut bacterial community among life stages of the rainbow stag beetle *Phalacrognathus muelleri* (Coleoptera: Lucanidae)[J]. Insects, 2020, 11(10): 719.
- [16] TANAHASHI M, MATSUSHITA N, TOGASHI K. Are stag beetles fungivorous?[J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 55(11): 983-988.
- [17] COSTA C, CASARI SA, VANIN SA. Larvas de Coleoptera do Brasil[M]. BR: Museu de Zoologia, 1988.
- [18] MORALES-JIMÉNEZ J, ZÚÑIGA G, RAMÍREZ-SAAD HC, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ C. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(1): 268-278.
- [19] DELALIBERA I Jr, HANDELSMAN J, RAFFA KF. Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae)[J]. Environmental Entomology, 2005, 34(3): 541-547.
- [20] GARDES M, BRUNS TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113-118.
- [21] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [22] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, McDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [23] EDGAR RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [24] XIANG XJ, HE D, HE JS, MYROLD DD, CHU HY. Ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea respond to short-term urea amendment in an alpine grassland[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 107: 218-225.
- [25] XIANG XJ, GIBBONS SM, LI H, SHEN HH, FANG JY, CHU HY. Shrub encroachment is associated with changes in soil bacterial community composition in a temperate grassland ecosystem[J]. Plant and Soil, 2018, 425(1/2): 539-551.
- [26] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): 1-18.
- [27] DIXON P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. Journal of Vegetation Science, 2003, 14(6): 927-930.
- [28] NGUYEN NH, SONG ZW, BATES ST, BRANCO S, TEDERSOO L, MENKE J, SCHILLING JS, KENNEDY PG. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. Fungal Ecology, 2016, 20: 241-248.
- [29] BASTIAN M, HEYMANN S, JACOMY M. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks[J]. Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media, 2009, 3(1): 361-362.
- [30] ELENA PÉREZ-COBAS A, MAIQUES E, ANGELOVA A, CARRASCO P, MOYA A, LATORRE A. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous

- cockroach *Blattella germanica*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(4): fiv022.
- [31] 郭琼钰. 橘小实蝇肠道真菌多样性及其对宿主的益生作用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2021.  
GUO QY. Diversity of the intestinal fungi in *Bactrocera dorsalis* and its probiotic effects on the host[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [32] KHAN Z, GENÉ J, AHMAD S, CANO J, AL-SWEIH N, JOSEPH L, CHANDY R, GUARRO J. *Coniochaeta polymorpha*, a new species from endotracheal aspirate of a preterm neonate, and transfer of *Lecytophora* species to *Coniochaeta*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(2): 243-252.
- [33] PRASANNA HN, RAMANJANEYULU G, RAJASEKHAR REDDY B. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp.[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 1-11.
- [34] 胡霞. 华山松大小蠹肠道微生物群落多样性与幼虫肠道纤维素降解菌的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2014.  
HU X. Gut-associated microbiota diversity of the white pine beetle (*Dendroctonus armandi*) and cellulolytic microbial community in its larval gut[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese).
- [35] EL-SAYED WS, IBRAHIM RA. Diversity and phylogenetic analysis of endosymbiotic bacteria of the date palm root borer *Oryctes agamemnon* (*Coleoptera: Scarabaeidae*)[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 1-10.
- [36] GAO GQ, GAO J, HAO CF, DAI LL, CHEN H. Biodiversity and activity of gut fungal communities across the life history of *Trypophloeus klimeschi* (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2010.
- [37] DOUGLAS AE. How multi-partner endosymbioses function[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(12): 731-743.
- [38] DOUGLAS AE. The B vitamin nutrition of insects: the contributions of diet, microbiome and horizontally acquired genes[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2017, 23: 65-69.
- [39] 陈勃生. 家蚕肠道微生物的多样性及其代谢功能探究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.  
CHEN BS. Biodiversity and metabolic functions of gut microbiota in silkworm *Bombyx mori*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [40] SUÁREZ-MOO P, CRUZ-ROSALES M, IBARRA-LACLETTE E, DESGARENNES D, HUERTA C, LAMELAS A. Diversity and composition of the gut microbiota in the developmental stages of the dung beetle *Copris incertus* say (*Coleoptera, Scarabaeidae*)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1698.
- [41] STEGEN JC, LIN XJ, FREDRICKSON JK, CHEN XY, KENNEDY DW, MURRAY CJ, ROCKHOLD ML, KONOPKA A. Quantifying community assembly processes and identifying features that impose them[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2069-2079.
- [42] LUAN L, LIANG C, CHEN LJ, WANG HT, XU QS, JIANG YJ, SUN B. Coupling bacterial community assembly to microbial metabolism across soil profiles[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00298-e00220.
- [43] YANG J, YU ZS, WANG BB, NDAYISENGA F. Gut region induces gastrointestinal microbiota community shift in Ujimqin sheep (*Ovis aries*): from a multi-domain perspective[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(12): 7603-7616.
- [44] YAN QY, LI JJ, YU YH, WANG JJ, HE ZL, van NOSTRAND JD, KEMPER ML, WU LY, WANG YP, LIAO LJ, LI XH, WU S, NI JJ, WANG C, ZHOU JZ. Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 4739-4754.
- [45] ZHOU JZ, NING DL. Stochastic community assembly: does it matter in microbial ecology?[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2017, 81(4): e00002-e00017.
- [46] DENG Y, ZHANG P, QIN YJ, TU QC, YANG YF, HE ZL, SCHADT CW, ZHOU JZ. Network succession reveals the importance of competition in response to emulsified vegetable oil amendment for uranium bioremediation[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(1): 205-218.