

贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性分析

俞和韦, 王中康, 刘莉, 夏玉先, 殷幼平*, 袁青, 曹月青, 彭国雄

(重庆大学生物工程学院, 重庆市功能基因及调控技术重点实验室, 重庆市杀虫真菌农药工程技术中心, 重庆 400030)

摘要: 【目的】分析贡嘎蝠蛾肠道(*Hepialus gonggaensis*)幼虫肠道真菌多样性。【方法】采用常规分离与分子鉴定的方法和基于 ITS(internal transcribed spacer)基因的 RFLP 方法, 建立贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌的 ITS 克隆文库, 分别用 *Msp*I、*Hae* 和 *Taq* 对 205 个阳性克隆的质粒酶切指纹图谱分析, 结果显示有 23 个不同的 RFLP 操作分类单元(OTU), 对这 23 个操作分类单元的阳性克隆子进行测序并绘制系统进化树。【结果】结果显示贡嘎蝠蛾幼虫肠道内存在 8 个属的真菌类群。其中被孢霉属(*Mortierella*)和丝孢酵母属(*Trichosporon*)的丰度最高, 分别占克隆文库的 46.34%和 40.00%, 鉴定为肠道内的优势真菌类群。用常规分离与分子鉴定方法只获得隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)、*Geomyces sp* 和丝孢酵母(*Trichosporon porosum*)3 个类群的真菌。结合常规分离法与 RFLP 法能够更有效的分析肠道微生物的多样性, 获得更多更全面的微生物多样性信息。

关键词: 贡嘎蝠蛾; ITS 序列; 真菌多样性; ITS 克隆文库; RFLP 分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0439-07

在昆虫肠道内存在大量的微生物, 它们可分为正常菌群和外来菌群, 这些肠道微生物对昆虫的生长发育有着重要意义^[1-3]。肠道微生物中大量的是细菌, 也有一些真菌。目前, 对昆虫肠道微生物区系的研究大多是针对细菌多样性研究, 而对肠道真菌多样性的研究的报道还比较少。

由于技术的限制, 目前能被分离培养而为人类了解的微生物仅是世界上微生物资源中极少的一部分, 仅有 5%的真菌类群能被分离培养和检测到^[4]。真核生物的核糖体 RNA 基因(rDNA)以串联重复方式存在于细胞核中, 其中 ITS 区不加入成熟核糖体, 受的选择压力较少, 进化速度较快, 从中可获得较多的进化信息; 而且由于 18S、5.8S 和 28S rDNA 高度保守, 能方便地设计上下游引物进行 PCR 扩增 ITS 区。对 ITS 扩增片段的 RFLP(restriction fragment length polymorphism)^[5,6]进行分析, 由于其操作简单快捷,

适合对扩增和克隆的大量 ITS 片段的初步分析或者是对混合种群的 ITS 进行测序前的简单筛选, 因此已经广泛适用于进行各种分子操作, 如种类鉴定^[7,8]和进化方式的研究^[9, 10]等都得到了可靠的数据^[11]。

贡嘎蝠蛾生长于高海拔地区, 其幼虫是名贵中药材冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*) 的优势寄主。由于在生长发育过程中容易受到各种病菌的侵染而死亡, 在人工养殖上一直没有大的突破。鉴于昆虫肠道微生物对于昆虫生长发育和抗逆力方面的重要生理功能以及贡嘎蝠蛾生长的特殊环境, 可能有着特殊的肠道微生物菌群, 本研究拟通过传统的分离培养的方法和建立贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌 ITS 序列克隆文库并用 RFLP 方法分析贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌的多样性, 为冬虫夏草人工繁育提供基础信息, 同时也为相关的昆虫肠道或其它环境中的真菌多样性及昆虫与微生物协同进化关系研究提供理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金(30572325)

*通讯作者: Tel: +86-23-65120489; fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@vip.sina.com

作者简介: 俞和韦(1981-), 男, 福建顺昌人, 硕士, 从事微生物多样性研究。E-mail: yuhewei54321@163.com

收稿日期: 2007-09-21; 修回日期: 2007-11-17

1 材料和方法

1.1 材料

贡嘎蝠蛾幼虫于 2006~2007 年间采自四川省康定雅家埂山脉, 海拔 4050 米, 土壤温度 9.6℃, 将采集的幼虫连土一起带回实验室, 取健康的 5~8 龄幼虫 77 头。实验前使其饥饿过夜, 排空体内食物残渣。

1.2 贡嘎蝠蛾幼虫肠道微生物的 PCR 扩增及产物纯化
取健康的贡嘎蝠蛾幼虫, 分别先用无菌水, 75% 酒精擦拭清洁幼虫体表, 并用 75% 酒精浸泡 3min 体表消毒; 无菌条件下解剖幼虫, 取其肠道, 加入 1mL 无菌水匀浆, 取适量放入 1.5mL 管中加入无菌水制成悬液备用。采用真菌 DNA 提取试剂盒 (Axygen) 提取贡嘎蝠蛾幼虫肠道微生物的总 DNA。

以贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌的总 DNA 为模板, 用真菌 ITS 区通用引物 ITS1F^[12](5'-TCCGTAGGTGACCTGCGG-3') 及 ITS4A^[13](5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC'-) 扩增。采用 50μL 的 PCR 反应体系。PCR 反应条件: 94℃ 4min; 94℃ 30s; 55℃ 30s; 72℃ 45s, 循环 30 次; 72℃ 7min。根据凝胶回收试剂盒 (Bioflux) 的操作说明对 PCR 产物进行纯化。

1.3 ITS 基因文库构建和测序分析

将纯化后的 ITS 片段与 pMD 18-T 载体按比例混合, 16℃ 过夜。酶连体系为 10.0μL, 其中 pMD18-T 载体 0.8μL, 含有 T4 连接酶的 Ligation Solution 5.0μL, 待插入 DNA 片段 4.2μL。转化过程根据 pMD 18-T 载体试剂盒 (TAKARA) 说明书进行, 最后在每管加入 890μL LB 培养基, 转移至 37℃, 225 r/min 摇床上, 温育 55min 使细菌复苏。取适量菌液涂布 Amp/X-gal/IPTG 平板, 37℃ 倒置培养 16h。挑取白色菌落接种于含有氨苄青霉素 (100μg/mL) 的 2mL 液体 LB 培养基的 EP 管中, 37℃, 225 r/min 培养 16h, 用质粒抽提试剂盒 (Bioflux) 提取质粒, 电泳后根据质粒的迁移情况分析是否是阳性克隆。

将检测获得的阳性克隆的质粒, 分别用限制性内切酶 *Msp*、*Hae* 和 *Taq* (Promaga) 进行酶切分析, 20μL 体系: 17μL 质粒溶液, 0.5μL 限制性内切酶溶液, 2μL 缓冲液和 0.2μL BSA 溶液。37℃ 温育 4h, 其中 *Taq* 酶切体系 65℃ 温育 4h。产物用含有溴化乙锭的 2.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 鉴别各个阳性克隆的 *Msp*、*Hae* 和 *Taq* 酶切图谱类型。根据该图谱分别对每一个文库中的所有克隆进行分型, 每一种类型即是分类操作单位 (operational taxonomic unit, OTU)^[14]。属于同一个 OTU 的克隆选一个代表进行测序。测序结果在 GenBank 中进

行序列同源性比较。选取相似程度最高的序列, 采用 PHYLIP3.66 的邻近相接法 (NJ) 对所有来源于贡嘎蝠蛾幼虫肠道的真菌序列与部分 GenBank 中的高同源性序列, 绘制贡嘎蝠蛾肠道真菌系统进化树。

1.4 贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌的分离培养及与非培养法所获得序列的比较

将匀浆后的贡嘎蝠蛾幼虫肠道内容物按梯度稀释法稀释成从 10^{-1} ~ 10^{-4} , 分别涂布马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、1/4 沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA)、马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PSA)、马丁氏培养基和高氏培养基上, 15℃ 培养。分离单菌落并分别接种于相应的液体培养基进行富集培养后提取 DNA。PCR 扩增 ITS 片段, 以 DNA 凝胶回收试剂盒回收扩增产物并纯化测序。序列的 BLAST 分析方法同上。用 PHYLIP3.66 的邻近相接法 (NJ) 对培养法获得的真菌序列与非培养法所得 ITS 序列进行系统发育分析。

2 结果和分析

2.1 贡嘎蝠蛾幼虫肠道内真菌的总 DNA 提取与 ITS 序列的 PCR 扩增

采用真菌基因组 DNA 小量抽提试剂盒成功提取到总 DNA 模板, 直接进行 PCR 扩增, 得到分子量约为 500bp 的相应的 ITS 扩增片段。

2.2 ITS 克隆文库的构建与筛选

将扩增的真菌 ITS 片段与 PMD18-T 载体连接后, 以空 PMD18-T 载体作为阴性对照, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 获得 205 个阳性克隆。经过 3 种限制性酶 *Msp*、*Hae* 和 *Taq* 酶切分析, 在 205 个阳性克隆中存在 23 个不同的酶切谱型, 见图 1。

2.3 RFLP 分析

将 RFLP 分离筛选获得的 23 个克隆的插入片段进行测序, 并进行 BLAST 分析显示, 23 个序列与 8 个属的真菌序列具有较高的同源性, 它们分别是 *Mortierella*、*Mucor*、*Trichosporon*、*Vouchered*、*Rhinochadiellas*、*Cephalosporium*、*Rhodiola* 和 *Mastigobasidium*。其中 7 个序列与 *Trichosporon* 属的两个不同种的序列具有 98%~99% 的同源性, 鉴定为 *Trichosporon* 属, 10 个序列中有 7 个与 *Mortierella* 属的不同种的序列具有 96%~99% 的同源性, 鉴定为 *Mortierella* 属, 其中 3 个与 GenBank 中的一些不可培养的序列或者与已知存在的 *Mortierella* 属的序列具有 84%~88% 的同源性, 可能是目前还尚未发现的种属。有 11 个序列与一些未知的真菌具有较高的同源性, 4 个序列与 GenBank

中已知序列同源性低于 97%，所有的序列均已上传到 GenBank，登录号及详细信息见(表 1)。

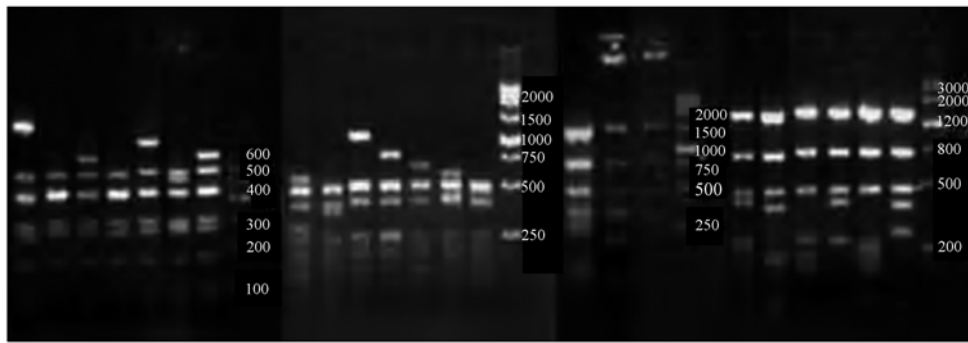


图 1 205 个阳性克隆子的质粒经过 *Msp*、*Hae* 和 *Taq* 酶切后的 23 种不同的酶切图谱

Fig. 1 Example of 23 OTU profiles of 205 clones digested with *Msp*, *Hae* and *Taq*, against DNA marker (Promega).

表 1 RFLP 操作单元的鉴定和序列分析

Table 1 Fungal identified using RFLP and sequence analysis

RFLP OTUS	Accession no.	Reference	Reference Accession no.	Identity /%
Hgf01	EU030387	Uncultured fungus clone D5 <i>Mortierella gamsii</i>	AF504849 DQ093723	98 99
Hgf02	EF685277	Uncultured fungus clone D5 <i>Mortierella gamsii</i>	AF504849 DQ093723	96 96
Hgf03	EU030388	Uncultured fungus clone D5 <i>Mortierella gamsii</i>	AF504849 DQ093723	98 99
Hgf04	EU030389	<i>Mucor hiemalis</i>	AJ876490	99
Hgf05	EU030390	<i>Mortierella cf. hyaline</i>	AY157495	98
Hgf06	EU030391	<i>Trichosporon pullulans</i>	AF444418	98
Hgf07	EU030392	Uncultured soil fungus clone 53-4 <i>Vouchered mycorrhizae clone</i>	DQ420919 EF026054	99 97
Hgf08	EU030393	<i>Rhinoctadiella atrovirens</i>	AY040855	98
Hgf09	EF685278	<i>Cephalosporium lanoso-niveum</i>	AJ292395	97
Hgf10	EU030394	<i>Trichosporon pullulans</i>	AF444418	99
Hgf11	EU030395	Uncultured fungus isolate dfmo0725_03 <i>Mortierella sp.</i>	AY969835 EF031107	98 88
Hgf12	EU030396	Uncultured fungus clone OTU37 <i>Mortierellales sp.</i>	EF521239 EF031099	98 99
Hgf13	EU030397	<i>Trichosporon porosum strain</i> <i>Uncultured basidiomycete</i>	AF414694 AJ876496	99 99
Hgf14	EU030398	Uncultured fungus clone OTU37 <i>Mortierellales sp.</i>	EF521239 EF031099	98 99
Hgf15	EU030399	Uncultured fungus clone OTU37 <i>Mortierellales sp.</i>	EF521239 EF031099	98 99
Hgf16	EU030400	<i>Trichosporon pullulans</i>	AF444418	98
Hgf17	EU030401	<i>Trichosporon pullulans</i>	AF444418	98
Hgf18	EF685279	<i>Rhodiola angusta</i>	AM039927	96
Hgf19	EF675597	Uncultured soil fungus clone 14-1 <i>Mortierella cf. hyalina</i>	DQ420852 AY157459	84 84
Hgf20	EU030402	<i>Trichosporon porosum strain</i> <i>Uncultured basidiomycete</i>	AF414694 AJ876496	99 99
Hgf21	EU030403	<i>Trichosporon pullulans</i>	AF444418	98
Hgf22	EU030404	Uncultured fungus isolate dfmo0725_03 <i>Mortierella sp.</i>	AY969835 EF031107	98 88
Hgf23	EU030405	Uncultured fungus clone TO20_OTU196 <i>Mastigobasidium intermedium strain</i>	EF434144 AF444630	98 92

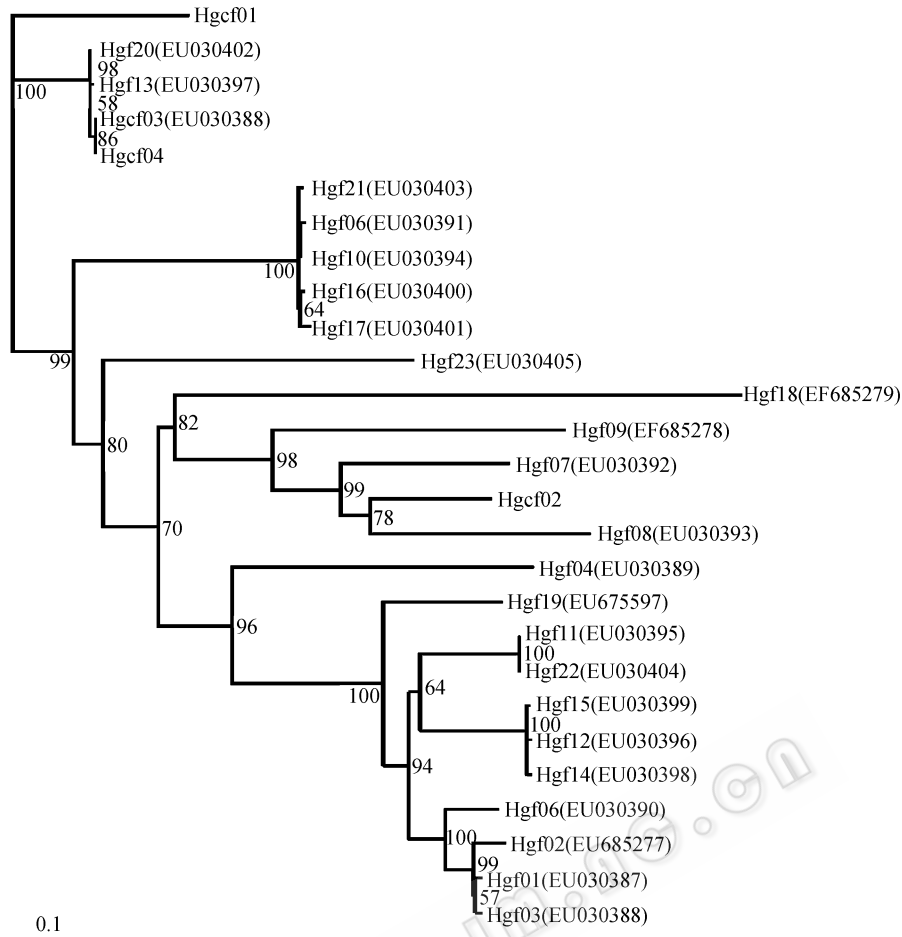


图 3 用 PHYLIP3.66 的邻近相接法对分离培养法得到的序列与分子方法得到的序列构建的进化树。

Fig. 3 Comparison the fungal isolated by conventional and molecular techniques. A neighbor-joining tree generated for fungal ITS sequences using a CLUSTAL W alignment with the optimality criteria set for Distance in PHYLIP 3.66. Numbers at nodes indicate bootstrap values for each node out of 100 bootstrap resampling (values below 50 are not shown).

3 讨论

对昆虫的肠道微生物多样性的研究大多数都是针对肠道中细菌。本研究以培养方法和非培养方法研究贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性。通过培养的方法获得 8 个真菌群落, 对其测序结果表明其中 6 个序列属于 *T. porosum*, 其它分别属于 *C. magnus* 和 *Geomyces sp.*; 测序分析表明, 这 23 个差异单元分别来自于 8 个不同属的真菌类群。从此结果可以看出, 贡嘎蝠蛾幼虫肠道中存在较为丰富的真菌类群, 而且两种方法所获得真菌种类及优势菌也有着一定差异。非培养法所获得真菌种类较培养法获得的种类多得多, 但是在非培养法所获得的序列中没找到与培养法获得的真菌 *C. magnus* 和 *Geomyces sp.* 菌属的同源序列, 其主要原因可能是贡嘎蝠蛾肠道中的真菌很多不能以常规分离培养方法所培养, 或者因为丰度太低或

生长太慢没有被分离纯化, 从而使得培养法所获得的种类及菌株远低于非培养法获得的种类; 而一些本来低丰度(难以被非培养法扩增鉴定)的种类由于培养条件适合而被富集, 从而在常规分离培养鉴定方法中被显示甚至成为“优势菌”, 而不被非培养法所识别。由此可见, 常规分离培养方法由于培养条件对菌株的选择性而使得所获得的微生物多样性和优势菌已经不是肠道中的真实情况。而必须结合分子生物学方法, 才能够反应肠道中真实情况。

对贡嘎蝠蛾肠道真菌 RFLP 序列的系统发育分析显示, 贡嘎蝠蛾幼虫肠道中的真菌主要属于 3 个纲, 它们分别是: Pezizomycotina, Agaricomycotina 和 Basal fungal lineages。其中 Basal fungal lineages 纲下被孢霉 *Mortierella* 属真菌占总克隆文库的 46.34%, 但是其中有 4 个序列与 GenBank 中登录的 *Mortierella sp* 属

的真菌序列的相似性小于 97%，应该是 *Mortierella* 属真菌的一些未被发现的种。该属真菌曾经在四川汶川县采集的新鲜冬虫夏草子座、菌核中及虫体多次被分离^[15]。杭州天缘药业有限公司利用从冬虫夏草幼虫分离的被孢霉属真菌(*Mortierella sp.*)经人工培养发酵的菌丝体加工制的至灵胶囊(国药准字 Z33020246)，具有与虫草有相似的作用。但该菌为接合菌门(Zygomycota)毛霉目(Mucorales)的菌物，与冬虫夏草所隶属的子囊菌门(Ascomycota)肉座菌目(Hypocreales)在分类地位、系统关系上相去甚远，不可能是形成冬虫夏草的无性型真菌^[16]。Agaricomycotina 纲下的 *Trichosporon* 属的真菌占总克隆文库的 40.00%。这两种真菌对整个肠道内微生态的作用以及是否与贡嘎蝠蛾幼虫的生长发育有关甚至与冬虫夏草形成相关，还有待进一步分析。

在蝠蛾幼虫肠道中，还发现一段序列与 *Cephalosporium.sp.* 属的真菌序列有 97%的相似性。该种菌曾经被浙江中药研究所工作人员从天然冬虫夏草新鲜标本中分离得到，经中国科学院微生物所有关专家鉴定为虫草头孢新种(*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov.)。该菌经培养获得的菌丝体的药理作用与冬虫夏草相似^[17]。目前，*Cephalosporium sp.*已经可以确认为冬虫夏草无性型的名称之一^[16]。由于本研究所用贡嘎蝠蛾采自四川康定冬虫夏草产区，贡嘎蝠蛾是当地冬虫夏草菌的优势寄主，在其肠道中发现 *Cephalosporium sp.*也就不足为奇了。RFLP 分析得到的另一真菌序列与长白红景天(*R. angusta*)的序列具有 96%的相似性，这很可能是由于这个序列是一个从未报道过的新种的真菌序列，它与景天科植物的序列具有较高的同源性；也可能是由于贡嘎蝠蛾幼虫食用了景天科的植物，遗留于肠道中的食物残渣的 DNA 被提取并被 PCR 扩增。用分子的方法共获得了 8 个属的真菌，其中大多数真菌都不能被所用培养基培养，有的可能是不可培养菌。

在实验中发现，尽管克隆子的 RFLP 图谱存在多种操作分类单元，但真菌种类则相对较少，往往同种真菌的 ITS 序列对应多种 RFLP 图谱，分析原因如下：(1) ITS 区段变异速率较快，系统发育分析中被归为同种真菌，但其 ITS 序列可能存在个别碱基的差异，从而造成酶切图谱差异；(2) 酶切时间和酶量等因素导致酶切效果产生差异，从而造成部分克隆子的质粒的酶切不完全，从而导致 RFLP 图谱的差异。

微生物纯培养技术的发明使微生物学研究获得

了长足的发展与进步。然而有研究显示,迄今为止,仍然有 99%以上的微生物不能通过传统的纯培养法获得。对于昆虫肠道微生物中的真菌多样性以及真菌对昆虫生理功能的研究还很少有人涉及。通过常规分离培养方法和 PCR-RFLP 方法认识贡嘎蝠蛾幼虫肠道内存在的真菌生物多样性的认识,将有助于我们了解整个肠道内真菌群体的地位及其对贡嘎蝠蛾幼虫的生长发育所起的作用。

参 考 文 献

- [1] Dillon RJ, Charnley AK. Chemical Barriers to Gut Infection in the Desert Locust: On Vivo Production of Antimicrobial Phenols Associated with the Bacterium *Pantoea agglomerans*, *J Invertebrate Pathology*, 1995, 66: 72–75.
- [2] Dillon RJ. Reassessment of the role of the insect gut microbiota. ABSTRACT BOOK I-XXI-International Congress of Entomology, Brazil, 2000, August, 20–26.
- [3] Jun T, Yasuhisa K. Intestinal Bacteria Affect Growth of *Bacillus thuringiensis* in Larvae of the Oriental Tea Tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *J Invertebrate Pathology*, 2000, 76: 222–226.
- [4] Hawksworth DL, Rossman AY. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 1997, 87: 888–891.
- [5] Vergin KL, Rappé, MS, Giovannoni SJ. Streamlined method to analyze 16S rRNA gene clone libraries, *BioTechniques*, 2001, 30: 938–944.
- [6] Michelle JP, David MS, David JA. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 2006, 261: 194–203.
- [7] Despres L, Kruger FJ, Imbert ED, et al. ITS – 2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species, *Int J Parasitol*, 1995, 25 (12): 1509–1514 .
- [8] Homan WL, Limper L, Verlaan M, et al. Comparison of the internal transcribed spacer . ITS1 from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum* EJ, *Parasitol Res*, 1997, 83 (3): 285–289.
- [9] Vernean O, Renaud F, Catzeffis F. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes, *J Mol Biol Evol*, 1997, 14 (6): 630–636.
- [10] Zhang W, Qu L, Gu H, et al. Studies on the origin and evolution of tetraploid wheats on the internal transcribed (ITS) sequence of nuclear ribosomal DNA, *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104 (6-7): 1099–1106.
- [11] 何毛贤, 黄良民. 长耳珠母贝核 rRNA 基因 ITS – 2 序列分析. 热带海洋学报(*Tropic Oceanology*), 2004, 23 (5): 81–84.

- [12] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts, *Mol Ecol*, 1993, 2: 113–118.
- [13] Larena I, Salazar O, González V, et al. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes, *J Biotechnol*, 1999, 75: 187–194.
- [14] Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(7): 2501–2507.
- [15] 陈庆涛, 王琪, 刘波. 蝙蝠蛾被孢霉[新种]的形态学研究. 山西大学学报(*Journal of Shanxi University*), 1986, 4: 70–74.
- [16] 蒋毅, 姚一建. 冬虫夏草无性型研究概况. 菌物系统(*Acta Mycologica Sinica*), 2003, 22(11): 61–176.
- [17] 王勤, 赵一. 冬虫夏草和头孢霉新种菌丝的某些药理作用的比较. 中国中医药杂志(*China Journal of Chinese Materia Medica*), 1987, 12(11): 42–44.

Analysis of fungal diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae

Hewei Yu, Zhongkang Wang, Li Liu, Yuxian Xia, Youping Yin*,
Qing Yuan, Yueqing Cao, Guoxiong Peng

(Key Lab of Genetic Function and Regulation, Bioengineering College, Chongqing University,
Chongqing Engineering and Technology Center of Fungal Insecticide, Chongqing 400030, China)

Abstract: [Objective] Studied fungi diversity in the guts of larval *Hepialus gonggaensis* using culture-independent and traditional culturing methods. [Methods] For the culture-independent method, the total DNA of fungus was extracted from the intestinal contents and internal transcribed spacer (ITS) regions were amplified with fungal universal primers. A near-full length ITS gene library was constructed. Subsequently, the fingerprints of the microorganisms were analyzed by isolated plasmid and digestion with *Msp*, *Hae* and *Taq* enzymes, respectively. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis based on the fungal ITS sequences indicated that the library established includes 23 operational taxonomic units (OTUS) and a phylogenetic tree depicted the linkage of the isolated fungi. [Results] Abundant fungi were in the intestines of *H. gonggaensis* larvae, but their abundance was very different. The dominant fungi belonged to *Mortierella* and *Trichosporon* and accounted for 46.34% and 39.02% of the total ITS clones, respectively. Only three genera of fungi were identified from eight isolated fungal populations by traditional culturing methods. [Conclusion] We could get more information by combined traditional culturing and molecular biology methods.

Keywords: *Hepialus gonggaensis*; ITS; fungal diversity; ITS clone library; RFLP

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30752325)

*Corresponding author. Tel: +86-23-65120489; Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@sina.com

Received: 21 September 2007/ Revised: 17 November 2007