

贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析

刘莉¹, 王中康¹, 俞和韦¹, 陈仕江², 阎光凡³, 夏玉先¹, 殷幼平^{1*}

¹ 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)

² 重庆市中药研究院生药栽培研究室, 重庆 400065)

³ 重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 408435)

摘要:【目的】对实验室养殖条件下的重要经济昆虫冬虫夏草寄主—贡嘎蝠蛾 (*Hepialus gonggaensis*, Hg) 幼虫肠道微生物群落的多样性进行了研究。【方法】采用常规分离培养与分子鉴定的方法和基于 16S rRNA 作为分子标记的变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 的方法。【结果】用常规分离与分子鉴定方法获得 8 个属的细菌类群, 其中肠杆菌属 (*Enterobacter*) 是优势菌群, 肉食杆菌属 (*Carnobacterium*) 是次优势菌群。对通过 DGGE 方法得到的 11 条 16S rRNA 优势条带序列进行了比对和系统进化树分析, 结果表明肉食杆菌属 (*Carnobacterium*) 的丰度最高, 是肠道细菌中主要的优势菌群, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是次优势菌群。DGGE 图谱还显示 Hg 幼虫不同虫龄肠道细菌菌群的结构存在差异, 推测可能与其发育生理状态的差异有关系。【结论】结合常规分离法与 DGGE 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: 贡嘎蝠蛾幼虫; 16S rRNA; 常规分离培养; 变性梯度凝胶电泳; 群落多样性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0616-07

冬虫夏草是中华虫草菌 (*Cordyceps sinensis* (Berkeley) Saccardo (1878)) 寄生于昆虫纲、鳞翅目、蝙蝠蛾科、蝠蛾属 (*Hepialus*) 昆虫形成的虫、菌结合体, 是我国特产传统珍稀名贵中药材。贡嘎蝠蛾 (*Hepialus gonggaensis* Fu & Huang) 是四川中药研究院发现的鳞翅目蝠蛾属新种^[1], 也是冬虫夏草的优势寄主。冬虫夏草天然资源稀少, 仅分布在四川、云南、青海、西藏等海拔 3000 m 以上的局部高寒草甸地带。蝠蛾自身生长发育缓慢, 从卵成长到幼虫到被真菌寄生生长出虫草需要 3 年以上, 而且在自然条件下, 幼虫成活率仅 3%~5%, 加上近年来全球气候变化、虫草滋生生态环境恶化, 以及人们的掠夺式采挖, 天然冬虫夏草已经濒临灭绝, 远远不能满足人们对冬虫夏草的需求。

组成肠道微生态系统的大量的正常微生物对昆虫的生长和发育起着重要作用, 如参与消化、营养吸收、繁殖^[2-4]与信息素的合成^[5], 同时在抵御外来菌的侵入与定植, 以及在加强免疫系统的功能中也起着重要作用^[6]。在国内外, 相对于其他领域的研究, 昆虫肠道微生物与其宿主的共生关系的研究刚刚起步, 仅见一些特殊的昆虫, 如白蚁^[7]、蚜虫^[8]和重要的农业害虫蝗虫^[3]。而国内的昆虫肠道微生态领域研究更是十分薄弱, 目前仅对具有重要经济价值的家蚕作了较全面的研究, 对其他的几种昆虫如天牛、黄粉虫与黑粉虫、日本龟蜡蚧、贡嘎蝠蛾、斑衣蜡蝉等有一些初步研究, 但是这些研究都是依靠传统的分离培养手段, 而由于人们的认知条件限制, 许多微生物尚难于被分离培养, 因此对于揭示昆虫肠道微生物区系的多

基金项目: 国家自然科学基金(30572325)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@sina.com

作者简介: 刘莉(1982-), 女, 河南永城人, 硕士, 从事昆虫微生物多样性研究。E-mail: liuli2008cq@163.com

收稿日期: 2007-09-11; 修回日期: 2007-12-26

样性有很大的局限性。16S rRNA 存在于所有的原核生物细胞中,被广泛用于细菌的系统学研究,是细菌种类鉴定的一个重要指标,特别是利用核糖体 16S rRNA 作为分子标记的变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)为不可培养微生物的优势菌群结构分析提供了有力的手段。基于 16S rRNA 的 PCR-DGGE 方法已经广泛地应用到环境微生物和动物(包括昆虫)肠道微生物的研究中^[9-10]。

卓风萍等^[11]采用传统分离培养方法已经初步证实贡嘎蝠蛾肠道有大量的肠道微生物,本研究采用分子生物学方法和常规传统方法相结合,旨在进一步揭示贡嘎蝠蛾肠道微生物多样性和优势菌群组成,探讨昆虫生理的改变对微生态结构的影响,为冬虫夏草幼虫培育和疾病防治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试幼虫及饲养方法:人工饲养幼虫由卵孵化后在实验室条件下饲养。卵由重庆中药研究院康定虫草基地提供。卵孵化后按照如下方法饲养:贡嘎蝠蛾幼虫在温度为 15 ± 1 光照培养箱中进行饲养,饲料为胡萝卜和珠芽蓼根段,土壤相对湿度 30%~40%,空气相对湿度 75%,光照 15~16h/d。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司,中国);DNA 纯化试剂盒、LATAq 酶(Bioflux, Japan);pMD-18T(TaKaRa, Japan);引物合成(上海生工生物技术公司,中国);Axygen 细菌 DNA 提取试剂盒(Axygen, USA);DGGE 电泳分析系统(Bio-Rad, USA),PCR 仪(Bio-Rad, USA),高速冷冻离心机(Beckman, Germany),核酸蛋白检测仪(Beckman, Germany)。

1.2 幼虫肠道的解剖和肠道微生物接种培养

取饲养至 2~6 龄的幼虫各 10 头,无菌水冲洗后用 75%酒精擦拭清洁幼虫体表,并于 75%酒精中浸泡 3 min 进行体表消毒;无菌条件下解剖幼虫,取其肠道,加入 1mL 无菌水制成匀浆液,迅速将匀浆液按 10 倍梯度稀释至 10^{-8} 。取 10^{-1} ~ 10^{-8} 稀释液各 0.1 mL,在不同的培养基(LB、PDA、PSA、MRA、查氏及伊红美兰培养基)平皿上涂布接种,于 15 ± 1 恒温培养箱中培养。所有的处理均做 3 次重复。

1.3 优势菌群鉴定程序

1.3.1 形态学和生理生化特性鉴定:根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[12]及《常见细菌系统鉴定手册》^[13]对所得的优势菌群进行形态和生理生化测定,并按可数性原则对每个平板上的典型目标菌落进行计数,不同菌落与总菌落数的比例为每种菌属的相对丰度。

1.3.2 优势菌的 16S rRNA 的扩增:以优势菌单菌落的菌悬液为 PCR 扩增模板,以 16S rRNA 的通用引物进行菌落 PCR 扩增。正向引物 27F (5'-AGAGTTTGA-TCCTGGCTCAG-3')和反向引物 1492R (5'-TACGGT-ACCTTGTTACGACTT-3')。采用 50 μ L 的 PCR 反应体系,PCR 反应条件:95 变性 4 min;94 , 45s, 56 , 45s, 72 , 2 min, 30 个循环;72 , 8 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收后与载体 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 JM109 进行培养,筛选阳性克隆并送上海生工生物技术公司进行测序。

1.4 幼虫肠道细菌 DGGE 分析

1.4.1 总 DNA 的提取:将 1.3 所述方法得到的肠道匀浆液转移至 EP 管中,10000 r/min 离心 5 min,去上清,沉淀用 Axygen 细菌 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。DNA 浓度用核酸蛋白检测仪测定。

1.4.2 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增:以提取的肠道细菌总 DNA 为模板,用细菌通用引物:P1:357f-GC (5'-GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')及 P2:518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行扩增,上游引物 P1 5 端有 40bpGC 夹(CGCCCGCCGCGCGC-GGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG)。PCR 采用 25 μ L 反应体系,反应条件:94 4 min;94 30s, 52 45s, 72 30s, 30 个循环;72 2 min。所得产物于 2%的琼脂糖凝胶上电泳。

1.4.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和产物分析:上述 PCR 产物浓缩后,采用 DGGE 分析系统进行电泳分离,8% (W/V) 的聚丙烯酰胺 (37.5:1, W/W),以变性剂尿素与甲酰胺线性梯度范围为 35%~53%。60 恒温,80V 16h,EB 染色 15~25 min, VersaDoc 2000 凝胶成像系统拍照,标记 DGGE 图谱中清晰的优势条带后割胶,捣碎后加入 30 μ L Sterilized ddH₂O, -20 浸泡过夜,离心取上清作为 PCR 的模板进行扩增,PCR 所用引物为带 GC 夹的 P1 和 P2。PCR 反应程序同 1.6 所述。得到的 PCR 扩增产物再以 DGGE 分离。

PCR 产物用纯化试剂盒(Bioflux)纯化后与载体 pMD18-T 连接,转化到 *E.coli* JM109 中,用菌落 PCR 方法检测阳性克隆。阳性克隆子送上海生工生物技术公司进行测序。测序结果于 NCBI 上进行 Blast 比对分析。条带所代表的优势菌属的相对丰度用每个条带荧光强度与所在泳道所有条带荧光总强度之比来表示。

1.4.4 数据分析:利用 NTSYS 分析软件进行聚类分析。并采用软件 Clustal W 和 PHYLIP3.67 的邻近法构建系统发育树。

2 结果和分析

2.1 贡嘎蝠蛾幼虫肠道可培养优势菌群的分离鉴定与序列分析

从 6 种培养基上共获得 11 个优势单菌落,对这 11 个菌落进行常规的形态和生理生化测定。菌株 Hg4-01, Hg4-02, Hg4-07 和 Hg4-09, 革兰氏阴性, 不产芽孢, 杆状, 好氧或者兼性厌氧, 氧化酶反应阴性, 过氧化氢酶反应阳性, 发酵葡萄糖产酸或者产气, 周生鞭毛运动或者无鞭毛, 符合肠杆菌科细菌特征。菌株 Hg4-03, 杆状, $0.5\sim 0.7\mu\text{m}\times 1.0\sim 2.0\mu\text{m}$, 革兰氏阳

性, 无芽孢, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 兼性厌氧, 发酵葡萄糖产酸, 16S rRNA 序列比对分析与 *Carnobacterium* sp. 有 99% 的同源性。菌株 Hg4-06 和 Hg4-08, 杆状, $0.5\sim 0.7\mu\text{m}\times 1.8\sim 4.0\mu\text{m}$, 革兰氏阴性, 不产芽孢, 单极鞭毛运动, 好氧, 接触酶阳性、氧化酶阳性, 16S rRNA 序列比对分析与 *Pseudomonas* 细菌有 99% 的同源性。菌株 Hg4-05 和 Hg4-11 革兰氏阴性, 不产芽孢, 短杆或者球状, $1\sim 1.5\mu\text{m}\times 1.5\sim 2.5\mu\text{m}$, 无鞭毛, 氧化酶反应阴性, 过氧化氢酶反应阳性, 葡萄糖发酵反应阴性, 16S rRNA 序列比对分析与 *Acinetobacter* 有 98% 以上的同源性。菌株 Hg4-04, 革兰氏阴性, 杆状, 无鞭毛不运动, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 16S rRNA 序列比对分析与 *Novosphingobium* sp. 有 98% 的同源性。菌株 Hg4-10, 革兰氏阴性杆状, 单鞭毛运动, 好氧, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 不发酵 D-葡萄糖和其它糖类, 16S rRNA 序列比对分析与 *Delftia* sp. 有 99% 的同源性。

16S rRNA 序列测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对, 分析显示(表 1), 11 个序列与 8 个属的细菌序列具有较高的同源性, 都有 98% 以上的同源性, 它们分别是 *Enterobacter*、*Carnobacterium*、*Novosphingobium*、

表 1 传统的分离培养法得到的细菌序列分析结果

Table 1 Bacteria identified using traditional culturing methods and sequence analysis

Isolate strains	Accession No.	Closest related species	Sequence length/bp	Identity/%
Hg4-01	EU304247	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain K9(EF175735)	1505	99
Hg4-02	EU304248	<i>Enterobacter amnigenus</i> (AM062093)	1507	98
Hg4-03	EU304249	<i>Carnobacterium</i> sp. ARCTIC-P2(AY573049)	1519	99
Hg4-04	EU304250	<i>Novosphingobium</i> sp. NIY3 (AB360760)	1453	98
Hg4-05	EU304251	<i>Acinetobacter</i> sp. CR9(AM295822)	1502	99
Hg4-06	EU304252	<i>Pseudomonas veronii</i> (AB334768)	1501	99
Hg4-07	EU304253	<i>Klebsiella</i> sp. TNT1(DQ229100)	1504	99
Hg4-08	EU304254	<i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-24(DQ219370)	1504	99
Hg4-09	EU304255	<i>Pantoea agglomerans</i> strain B1(DQ133596)	1504	98
Hg4-10	EU304256	<i>Delftia</i> sp. ZM-1(EF061135)	1497	99
Hg4-11	EU304257	<i>Acinetobacter</i> sp. CR9(AM295822)	1502	98

Acinetobacter、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Pantoea* 和 *Delftia*。其中 Hg4-01 和 Hg4-02 菌落与总菌落数的比例最高, 分别与 *Enterobacter ludwigii* strain 和 *Enterobacter amnigenus* 有 99% 和 98% 的同源性, 是肠道中的第一优势菌群。其次, 就是 Hg4-03, 它与 *Carnobacterium* sp. ARCTIC-P2 有 99% 的同源性, 是可培养肠道细菌中次优势菌群。

2.2 蝠蛾肠道细菌总 DNA 的扩增产物变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱分析

对人工饲养的贡嘎蝠蛾 2 龄幼虫至 6 龄幼虫肠道细菌的 DGGE 图谱分析(图 1-A)。结果表明, 从 2 龄幼虫到 6 龄幼虫, 不同虫龄的 DGGE 图谱有一定的差异, 值得注意的是, 不同龄期的幼虫肠道中出现两条明显的共有条带(标记为 Hg1-07 和 Hg1-08), 这两

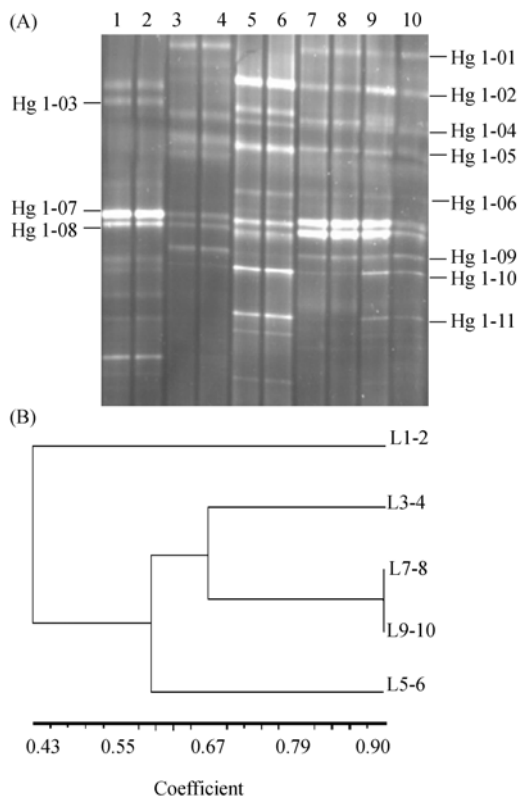


图 1 贡嘎蝠蛾 *Hepialus gonggaensis* 幼虫不同虫龄肠道优势细菌的 DGGE 图谱和聚类分析

Fig. 1 1-A DGGE profiles of *Hepialus gonggaensis*' intestinal microba for different stage larvae. L1-2 means 2 instar sample, L3-4 means 3 instar sample, L5-6 means 4 instar sample, L7-8 means 5 instar sample, L9-10 means 6 instar sample; 1-B Cluster dendrogram analysis based on DGGE bands in gel.

条优势主带并不随着虫龄的变化而发生改变,将此两条带割胶回收,测序结果表明二者分别是肉食杆菌属 (*Carnobacterium*)和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。聚类分析结果(图 1-B)显示,5 龄幼虫和 6 龄幼虫肠道细菌群落相似性最高,达到 90%。而其他虫龄之间细菌群落相似性低,其中 2 龄幼虫与其他几龄幼虫肠道细菌群落相似性只有 59%。

2.3 蝠蛾肠道细菌序列比对与系统发育分析

表 2 显示,贡嘎蝠蛾肠道细菌 16S rRNA V3 区间的序列与现有的数据库中的细菌序列有很高的相似性,都在 98%以上,对分离得到的 11 条优势条带测序结果显示,优势细菌主要属于变形菌(Proteobacteria)和壁厚菌门(Firmicutes),共有 5 个科,分别是 Pseudomonadaceae, Carnobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Bacillaceae 和 Enterobacteriaceae,肉食杆菌属 (*Carnobacterium*),占整个条带荧光强度的 23.86%,是肠细菌中主要的优势菌,芽孢杆菌属(*Bacillus*)是次优势菌群(图 2)。

分子鉴定方法与常规培养方法得到的幼虫肠道微生物相对丰度有一定的差异,用分子生物学方法获得的相对丰度比较高的优势菌多是不可培养的细菌,而用常规培养方法获得的相对丰度高的细菌在分子生物学检测结果中大多为低丰度细菌。

表 2 贡嘎蝠蛾幼虫肠道优势细菌 DGGE 指纹对应的单个条带的序列比对结果

Table 2 Sequences analysis of 16S rDNA recovered from single band in DGGE bacterial fingerprints

Band No.	Accession No.	Closely identified phylogenetic relatives	Identity/%
Hg1-01	EU139494	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.(AM398415)	99
Hg1-02	EU139495	<i>Pseudomonas</i> sp. Z48 (AB325621)	98
Hg1-03	EU139496	<i>Bacterium</i> THCL10 (EU086556)	100
Hg1-04	EU139497	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain P13 (EF487999)	100
Hg1-05	EU139500	<i>Sphingobium</i> sp. x23 (EU095328)	100
Hg1-06	EU139499	<i>Citrobacter freundii</i> strain (EU124385)	99
Hg1-07	EU139498	<i>Carnobacterium</i> sp. ARCTIC-P2 (AY573049)	100
Hg1-08	EU139501	<i>Bacillus subtilis</i> strain (EU124386)	100
Hg1-09	EU139502	<i>Enterobacter</i> sp. FMB-1 (DQ855282)	99
Hg1-10	EU139503	<i>Enterobacter aerogenes</i> (AB244468)	99
Hg1-11	EU139504	<i>Hafnia alvei</i> (AB244473)	99

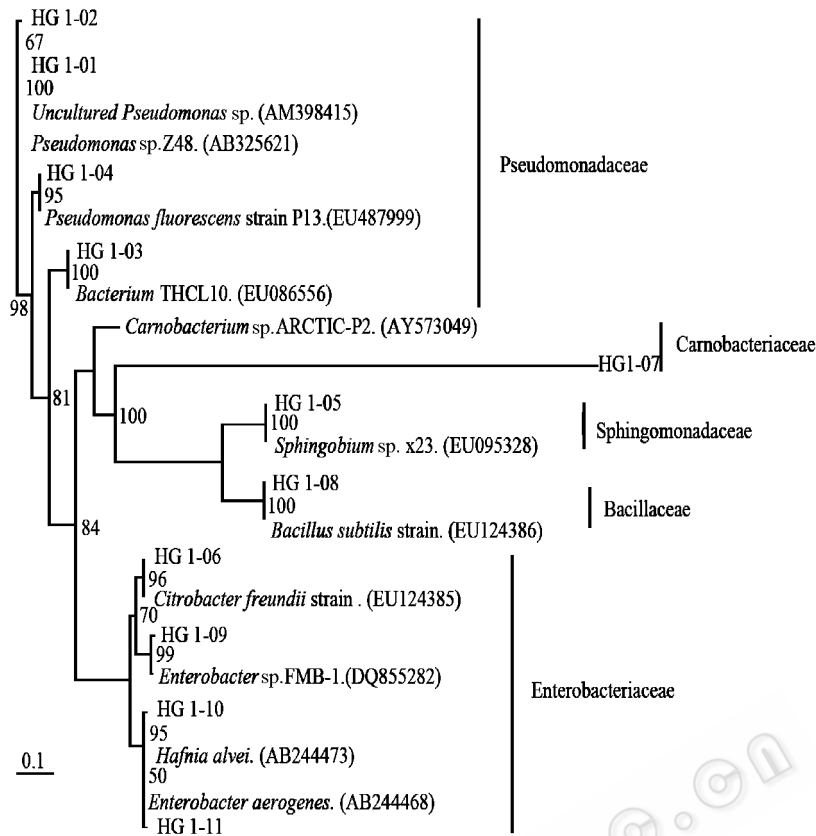


图 2 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis for bacterial 16S rRNA sequences using a Clustal W alignment with the optimality criteria set for Distance in PHYLIP 3.67. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, sequence divergence.

3 讨论

利用分子生物学方法(DGGE)和常规分离培养法对重要资源昆虫贡嘎蝠蛾幼虫肠道微生物的多样性分析结果表明,贡嘎蝠蛾肠道微生物群落结构相对于哺乳动物来说比较简单,和其他的鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性相似^[14]。两种分析方法中都检测到肉食杆菌属。这是一类可培养的乳酸类细菌,将这株菌添加到幼虫的饲料中,发现它对幼虫具有促生长的作用(结果另文发表)。现有研究已经发现该属的很多种类可以产生短链脂肪酸(VFAS),短链脂肪酸可通过直接或间接的途径促进昆虫消化道的蠕动,还可作为氧化和生物合成的前提物质,可以作为饲料添加剂^[15]。本研究也发现了和 *Pantoea agglomerans* 一致性为 98% 的细菌。Dillon and Charnley^[5]在研究蝗虫肠道优势菌 *Pantoea agglomerans* 功能时,发现将该菌接种到无菌蝗虫后,蝗虫肠道中出现一种抗真菌酚类物质,它能抑制虫生真菌孢子萌发的能力。

在常规分离培养中发现,在野生环境条件下生长的贡嘎蝠蛾幼虫肠道内第一优势细菌是葡萄球菌^[11]。在人工环境生长的蝠蛾幼虫肠道中却没有被培养到。葡萄球菌是广泛分布在自然界中的一类细菌,在许多昆虫肠道中均有发现, Takatsuka 和 Kunimi 发现茶长卷叶蛾 (*Homona magnanima*) 的肠道中的葡萄球菌对入侵主体内的苏云金杆菌生长和繁殖有抑制作用^[16]。何正波^[17]在研究天牛肠道微生物发现,葡萄球菌是主要的肠道菌。这些葡萄球菌对贡嘎蝠蛾幼虫有怎样的影响还不清楚。比较直接从野生环境采集的幼虫和经人工模拟野生环境饲养的幼虫两种处理分离的可培养的细菌发现,两种环境下幼虫肠道细菌的数量和种类都有差异。Dillon and Charnley 也有类似的报道,他们研究了蝗虫 (*Schistocerca gregaria*) 肠道微生物数量和种类,结果显示肠道微生物的数量和种类会因食物的不同发生很大的变化^[4],这可能是由于肠道微生物的数量及种类和昆虫的营养密切相关。Hayashi 等在以家白蚁 (*Coptotermes formosanus*) 为

模式生物的研究中发现, 随着食物结构发生改变, 宿主肠道中的优势菌群也随之发生改变^[18]。

两种分析方法得到的肠道细菌群落的优势菌群有一定的差异, 用分子生物学方法获得的相对丰度比较高的优势菌多是不可培养的细菌, 而用常规培养方法获得的相对丰度高的细菌在分子生物学检测结果中大多为低丰度细菌; 分子生物学方法得到的优势菌主要属于肉食杆菌属(*Carnobacterium*), 而用常规培养的方法得到的优势菌主要是肠杆菌属(*Enterobacter*)。其原因是由于常规的分离培养方法不可避免会对微生物起筛选作用, 这样得出的特定生境中微生物多样性可能偏离实际情况, 如一些低丰度的细菌在提供的合适的条件下迅速生长, 并成为优势菌; 反之, 一些本来高丰度的微生物由于不适应人工提供的培养条件而不能被分离鉴定出来。因此常规分离鉴定方法不能真正显示肠道中微生物的多样性及种群结构。基于 16S rRNA 的 PCR-DGGE 指纹以及克隆测序技术为我们提供了一条快速揭示冬虫夏草幼虫肠道微生物区系组成的有效途径由于 16S rRNA 的 V3 区片段的保守性, 因此一般只要两个菌株的序列有差异, 就可认为此两个菌株为不同的种或株系。但是 DGGE 方法本身也有一些缺陷, 如对 500 bp 以上的片段分辨率较低, 会出现共迁移等现象; 扩增片段太小则难于显示出微生物的种间差异; 对极低丰度的细菌检测有困难等, 因此, 即使用此方法所展示的细菌群落多样性可能比肠道中实际的微生物种类相对要少些。而要获得完整准确可信的肠道微生物多样性信息, 还需要结合其他的技术分析。

参 考 文 献

- [1] 傅善全, 黄天福, 罗庆明. 蝙蝠属一新种(鳞翅目: 蝙蝠蛾科). 昆虫学报(*Acta Entomologica Sinica*), 1991, 34 (3): 362-363.
- [2] Tokuda G, Watanabe H, Matsumoto T, *et al.* Cellulose digestion in the wood-eating higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulase and properties of Endo- β -1,4-glucanase. *Zoological Science*, 1997, 14: 83-97.
- [3] Dillon RJ, Charnley AK. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 2002, 153 (8): 503-509.
- [4] Campbell BC. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In: Bernays E. ed. *Insect Plant Interactions*. Boca Raton: CRC Press. 1989.
- [5] Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. A note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J Appl Microbiol*, 2002, 92: 759-763.
- [6] 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.
- [7] Brauman A, Doré J, Eggleton P, *et al.* Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 35(1): 27-36.
- [8] Douglas AE, Darby AC, Birkle LM, *et al.* The ecological significance of symbiotic microorganisms in animals: Perspectives from the microbiota of aphids. In: Hails RM, Beringer J, Godfray HC eds. *Genes in the Environment*. Oxford: Blackwell Publishing. 2002, 306-325.
- [9] Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, *et al.* Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture independent methods. *App. Environ Microbiol*, 2004, 70 (1): 293-300.
- [10] Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, *et al.* Application of 16S rDNA DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*. *Insect Mol Biol*, 2003, 12 (1): 85-91.
- [11] 卓凤萍, 陈仕江, 殷幼平, 等. 贡嘎蝙蝠幼虫肠道菌群的分析. 重庆大学学报(自然科学版) [*Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)*], 2004, 27(11): 26-29.
- [12] John GH, Nobel RK, Peter HA, *et al.* *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press. 1994.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 相辉, 李木旺, 赵勇, 等. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16SrDNA 文库序列分析. 昆虫学报(*Acta Entomologica Sinica*), 2007, 50(3): 222-233.
- [15] 朱文森, 刘稳. 乳酸菌细菌素的研究动向. 生物技术(*Biotechnology*), 1999, 9(6): 32-36.
- [16] Takatsuka J, Kunimi Y. Intestinal Bacteria Affect Growth of *Bacillus thuringiensis* in Larvae of the Oriental Tea Tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76: 222-226.
- [17] 何正波, 殷幼平, 曹月青, 等. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2001, 41 (6): 741-744.
- [18] Hayashi A, Aoyagi H, Yoshimura T, *et al.* Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(4): 358-367.

Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae

Li Liu¹, Zhongkang Wang¹, Hwei Yu¹, Shijiang Chen², Guangfan Yan³, Yuxian Xia¹, Youping Yin^{1*}

¹ Bioengineering College of Chongqing University, Key Lab of Genetic Function and Regulation, Engineering and Technology Center of Fungal Insecticide, Chongqing 400030, China)

² Biological Medicine and Cultivation Department, Research Institute of Chinese Herb Medicine, Chongqing 400065, China)

³ College of Biological Information, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 408435, China)

Abstract: [Objective] We investigated the intestinal microbial diversity in the larval gut of *Hepialus gonggaensis*, an economically important insect. **[Methods]** We used morphological, physiological, chemotaxonomic characteristics and 16S rRNA analysis method, and the molecular method of PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analysis based on the sequence of 16S rRNA V3 region gene. **[Results]** By the traditional isolation method, 8 genera of bacteria were identified from 11 isolated bacterial populations. The dominant bacteria in intestine belonged to *enterobacter*. By 16S rRNA V3 region gene DGGE method, eleven distinct bands were obtained from 16S rDNA amplicons. The bands were purified, sequenced. The sequences aligned with GenBank database and showed that they were belonged to 8 different genera of bacteria. Phylogenetic analysis showed that the sequences of bacteria belonged to the Proteobacteria and Firmicutes. The most dominant bacteria group was *Carnobacterium* in the gut and *Bacillus* followed by it. The different patterns were observed in different instars larvae guts from DGGE profiles, which might be related to their physiological development stages. **[Conclusion]** 8 genera were obtained from intestine of *H. gonggaensis* by traditional culturing method and 16S rDNA analysis method respectively, but the two groups were not exactly same, and the dominant group was different also. This suggested that a combination of molecular and traditional culturing methods can be used to analyze and monitor the diversity of intestinal microflora effectively, and that will give us more information of microorganism diversity.

Keywords: *Hepialus gonggaensis*; 16S rRNA; normal isolation culture; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); specie diversity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572325)

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

Received: 11 September 2007/ Revised: 26 December 2007

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介(2008-03)



蛋白质: 结构与功能(译)

[英] D. 惠特福德 著; 魏群 主译; 978-7-03-021010-4; ¥79.00; 2008年3月20日出版

蛋白质结构功能的研究是从分子水平了解生命现象的基础。本书涉及的知识范围很广,从氨基酸到蛋白质的三维结构及检测方法,酶、膜蛋白、纤维蛋白等的结构功能,酶的催化和动力学,蛋白质的表达、纯化、合成、加工及在细胞中的周转,蛋白质的多样性和蛋白质组学,蛋白质体内外的折叠及蛋白质结构与医学分子生物学的进展等。本书适合作为国内大专院校生命科学领域本科生和研究生的教材或教学参考用书,也可供研究生命科学的相关人员及有兴趣了解现代生命科学的人士阅读。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目