

蟋蟀肠道细菌多样性的宏基因组分析*

张 科^{1**} 刘伍限² 郑新华¹ 刘冰许³

(1. 平顶山学院, 平顶山 467000; 2. 河南省郑州市动物卫生监督所, 郑州 450000;

3. 郑州市动物园, 郑州 450000)

摘 要 【目的】了解油葫芦属蟋蟀成虫前中肠和后肠肠道细菌的多样性。【方法】首先, 基于 mtDNA-16S rRNA 基因对蟋蟀进行分子鉴定, 然后从蟋蟀前中肠和后肠分别提取总 DNA, 再使用 Illumina Miseq 平台进行细菌 16S rRNA v3-v4 变异区进行测序, 最后分析蟋蟀肠道微生物的群落组成和多样性。【结果】蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 基因分析结果显示归属于油葫芦属, 暂时命名为平顶山油葫芦。细菌 16S rRNA 基因宏基因组测序分析, 前中肠共获得 21 799 条 reads, 857 个操作分类单元(Operational taxonomic unit, OUT), 后肠获得 16 515 条 reads, 2 155 个 OUT。99%的蟋蟀肠道细菌归属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。前中肠归入 232 个属, 前 5 个属分别是: 乳球菌属(33.47%), 泛菌属(21.50%), 肠杆菌属(15.47%), 沃尔巴克氏体属(9.47%)和魏斯菌属(5.34%); 后肠归入 152 个属, 前 5 个属分别是: 未分类的瘤胃球菌科成员(Unclassified Ruminococcaceae)(30.07%), *Parabacteroides*(10.93%), *Incertae sedis*(9.74%), *Alistipes*(5.86%), 类杆菌属(5.50%), *Dysgonomonas*(4.91%)。【结论】mtDNA-16S rRNA 是油葫芦属分子鉴定的有效工具。蟋蟀肠道含有丰富的微生物资源, 为后续的肠道微生物资源开发奠定了基础。

关键词 油葫芦属, MtDNA-16S rRNA, 肠道细菌, 多样性, 16S rRNA

Metagenome analysis of bacterial diversity in cricket intestines

ZHANG Ke^{1**} LIU Wu-Xian² ZHENG Xin-Hua¹ LIU Bing-Xu³

(1. Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China; 2. Animal Health Supervision Institute of Zhengzhou

City Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 3. Zhengzhou Zoon, Zhengzhou 450000, China)

Abstract 【Objectives】To clarify bacterial diversity in the anterior midgut and posterior intestine of Crickets. 【Methods】Molecular identification of crickets was carried out based on the cricket 16S rRNA sequence. Total DNA from the anterior midgut and posterior intestine was then isolated and bacterial 16S rRNA v3-v4 sequenced by Illumina Miseq. Finally, the bacterial community composition and diversity in anterior midgut and posterior intestine was analyzed. 【Results】Analysis of MtDNA-16S rRNA showed that all crickets belonged to the genus *Teleogryllus*, with the provisional species name *Teleogryllus* spp. from Pingdingshan. A total of 21 799 reads clustered into 875 OUTs were obtained from the anterior midgut, and 16 515 reads clustered into 2 155 OUTs from the posterior intestine. Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes accounted for 99% of the bacteria identified in both the anterior midgut and posterior intestine. At the genus level, *Lactococcus* (33.47%), *Pantoea* (21.50%), *Enterobacter* (15.47%), *Wolbachia* (9.47%) and *Weissella* (5.34%) were the most abundant of 232 genera identified in the anterior midgut, and unclassified Ruminococcaceae (30.07%), *Parabacteroides* (10.93%), *Incertae sedis* (9.74%), *Alistipes* (5.86%), *Bacteroides* (5.50%), *Dysgonomonas* (4.91%) were the most abundant of 152 genera identified in the posterior intestine. 【Conclusion】MtDNA-16S rRNA is an effective tool for *Teleogryllus* molecular identification. Cricket intestines are rich in microbial resources and may have the potential for the development of such resources.

Key words *Teleogryllus*, MtDNA-16S rRNA, intestine bacteria, bacterial diversity, 16S rRNA

*资助项目 Supported projects: 2014 年度平顶山学院高层次人才科研启动经费(PXY-BSQD-2015006); 河南省高等学校重点科研项目(16B180004); 平顶山学院病原生物学重点学科; 中央财政支持项目(ZXPT2015001); 嵩山地区野生动物常规普查(YLJP20142010ZX)

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: kekely555@126.com

收稿日期 Received: 2016-07-25, 接受日期 Accepted: 2016-09-27

蟋蟀科 Gryllidae 隶属于直翅目 Orthoptera 蟋蟀总科 Grylloidea, 是蟋蟀总科中种类最多的类群 (蒋国芳等, 2004)。它既是食用昆虫、药用昆虫和文化昆虫 (陈天嘉和任定成, 2011), 又是农业害虫 (陈德胜等, 2006; 姜世和尚统锐, 2008)。蟋蟀食性繁杂, 具有丰富的肠道微生物资源 (Jws, 1998; Satokari *et al.*, 2001) 还是人类的微生物资源宝库。因此, 蟋蟀具有极高的科研和应用价值。

可培养的微生物占微生物总量的 0.1%~1% (Bakken, 1985; Amann *et al.*, 1995; Kellenberger, 2001), 随着分子生物学技术的发展, 宏基因组测序分析技术成为公认的研究微生物多样性的有效手段 (Gewin, 2006)。然而, 采用宏基因组学技术对蟋蟀肠道微生物多样性的研究未见报道。因此, 我们选择了北方常见的油葫芦属 *Teleogryllus* 的蟋蟀 (直翅目: 蟋蟀科), 首先基于昆虫 16S rRNA 基因对其进行分子鉴定, 然后采用高通量测序技术测序蟋蟀前中肠和后肠细菌 16S rRNA v3~v4, 分析蟋蟀的肠道细菌群落特征和多样性。本研究为进一步挖掘蟋蟀肠道微生物资源提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2015 年 9 月, 在河南省平顶山市白龟湖国家湿地公园采集蟋蟀成虫, 带回平顶山学院低山丘陵区生态修复重点实验室, -80℃保存备用。

1.2 蟋蟀前中和后肠道总 DNA 的提取

首先, 从 -80℃冰箱取出蟋蟀, 在超净工作台内, 无菌水冲洗 3 遍, 75%医用酒精浸泡 5 min; 然后, 解剖蟋蟀, 取其前中肠 (X1)、后肠 (X2), 加入适量的无菌水, 分别在研钵内研磨; 最后, 使用基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒, 货号, DP304-03) 按照试剂盒说明书, 分别提取蟋蟀前中肠和后肠总 DNA, -20℃保存备用。

1.3 mtDNA-16S rRNA 基因扩增、测序与系统发育分析

基因扩增: 首先, 在华大基因合成昆虫 16S

rRNA 通用引物, F (LR-J-12887): 5'-CCGGT-CTGAATCAGATCACGT-3' (Simon *et al.*, 1994); F (LR-N-13398): 5'-CGCCTGTTTAA-CAAAAACAT-3' (蒋国芳等, 2004)。扩增体系: 2×Es MasterMix (康为, 货号: CW0690), 17.5 μL; 引物, 2 μL; 模板 DNA, 2 μL; ddH₂O 补足 35 μL。扩增程序: 首先, 95℃预变性 5 min; 然后 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 35 个循环; 最后, 72℃延伸 7 min。然后, 使用 1%琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增产物; 最后, PCR 扩增产物合格后送交华大基因研究院进行 DNA 样品测序, 测序仪器为 ABI3730 序列分析仪。

序列分析: 首先, 将测序后的组装结果在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析, 并选择参考序列 (表 1); 然后, 使用 Sequin 将测序结果提交至 NCBI; 第三, 以蝼蛄科 (Eneopteridae) 的云斑金蟋 *Xenogryllus marmoratus* 为外群, 使用 Clustal X (2.0) 进行同源比对, 在 Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) 软件中计算序列差异, 采用 Neighbor-Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) 和 Minimum Evolution (ME) 法, 系统树各分支置信度 Bootstrap 1 000 次检验, 构建系统发生树。

1.4 宏基因组测序

使用 BioSpec-nano (日本岛津) 检测蟋蟀前中肠和后肠总 DNA 样本 (DNA 含量>1 μg, 浓度>500 ng/μL), DNA 样品合格后送交苏州贝斯派生物技术有限公司进行宏基因组测序。测序平台: Illumina Miseq; 测序区域: 细菌 16S rRNA v3~v4 区; 测序引物: 341F: 5'-CCCTACAC-GACGCTCTTCCGATCTG-3'; 805R: 5'-GACTG-GAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'。

1.5 宏基因组数据的生物信息学分析

首先使用 Qiime 和 UCHIME Algorithm 等软件去除原始数据中非靶区域序列、嵌合体和低质量的测序数据, 得到有效数据; 然后, 使用 Bootstrapping 方法估计分类的可信度 (≥80%, V3、V4 区的序列可以正确分配到属的概率分别是 98.1%和 95.7% (Claesson *et al.*, 2008), 根据序列的相似度, 进行 OTU (Operational taxonomic

表 1 蟋蟀总科 23 个种的分类及其 mtDNA-16S rRNA 基因 GenBank 登录号
Table 1 The taxonomy of Grylloidea 23 species and the GenBank accession numbers of their mtDNA-16S rRNA genes in this study

科 Class	属 Genus	种 Species	mtDNA-16S rRNA 基因 GenBank 登录号 GenBank accession numbers
蟋蟀科 Gryllidae	油葫芦属 <i>Teleogryllus</i>	黄脸油葫芦 <i>Teleogryllus emma</i>	AY509567
		银川油葫芦 <i>Teleogryllus infernalis</i>	JQ067635.1
		北京油葫芦 <i>Teleogryllus mitratus</i>	AY239106.1
		北京油葫芦 <i>Teleogryllus mitratus</i>	AY239105.1
		北京油葫芦 <i>Teleogryllus mitratus</i>	AY509568.1
		黑脸油葫芦 <i>Teleogryllus occipitalis</i>	EF685930.1
		滨海油葫芦 <i>Teleogryllus oceanicus</i>	JX269095.1
		滨海油葫芦 <i>Teleogryllus oceanicus</i>	JX269096.1
		黄褐油葫芦 <i>Teleogryllus derelictus</i>	AF514610.1
	斗蟋属 <i>Velarifictorus</i>	迷卡斗蟋 <i>Velarifictorus micado</i>	AF514613
		迷卡斗蟋 <i>Velarifictorus micado</i>	KJ612521.1
	灶蟋属 <i>Gryllodes</i>	短翅灶蟋 <i>Gryllodes sigillatus</i>	AF514593
		短翅灶蟋 <i>Gryllodes sigillatus</i>	KR903701.1
	蟋蟀属 <i>Gryllus</i>	家蟋 <i>Acheta domesticus</i>	Z97627
		田蟋 <i>Gryllus campestris</i>	AF248686
		田蟋 <i>Gryllus campestris</i>	JX269079.1
		双斑蟋 <i>Gryllus bimaculatus</i>	KR903675.1
		双斑蟋 <i>Gryllus bimaculatus</i>	KM508904.1
		<i>Gryllus assimilis</i>	JX269052.1
		<i>Gryllus multipulsator</i>	EF050746.1
		<i>Gryllus fultoni</i>	AF248688.1
		<i>Gryllus integer</i>	JX269071.1
		<i>Gryllus vocalis</i>	JX269076.1
		<i>Gryllus texensis</i>	JX269056.1
		<i>Gryllus rubens</i>	JX269058.1
		<i>Gryllus lineaticeps</i>	KM508905.1
		<i>Gryllus personatus</i>	KM508915.1
		<i>Gryllus ovisopis</i>	JX269066.1
		<i>Gryllus firmus</i>	JX269069.1
		<i>Gryllus pennsylvanicus</i>	KM508902.1
蛩蟋科 Eneopteridae	<i>Eneopterinae</i>	<i>Xenogryllus marmoratus</i>	KR903830.1

unit) 聚类分析 (Edgar, 2013) ;第三, 采用 RDP (Ribosomal database project) classifier 贝叶斯算法对 97%相似度水平的 OTU 代表序列与 RDP classifier 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/misc/resources.jsp>) (Maidak *et al.*, 1996) 进行比对, 最终在界、门纲、目、科、属、种各层级统计各

个样品的细菌分布;第四, 使用 MEGAN 5.7.1 分析前中肠和后肠肠道细菌在每一个层级的菌群丰度, 并构建系统进化树;最后, 使用 Mothur 软件分析阳平的 Chao1 指数, Simpson 指数, Shannon 指数, ACE 指数对宏基因组数据进行 Alpha 多样性分析 (Schloss *et al.*, 2009)。

2 结果与分析

2.1 蟋蟀的分子鉴定

蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 测序结果上传至

NCBI, 登录号为: KX078224; 基于我们测序的数据和参考序列, 以蝼蛄科的云斑金蟋为外群, 构建 NJ 树和 ME 树见图 1。结果表明, 分枝的最高和最低置信值分别是 100 和 34。

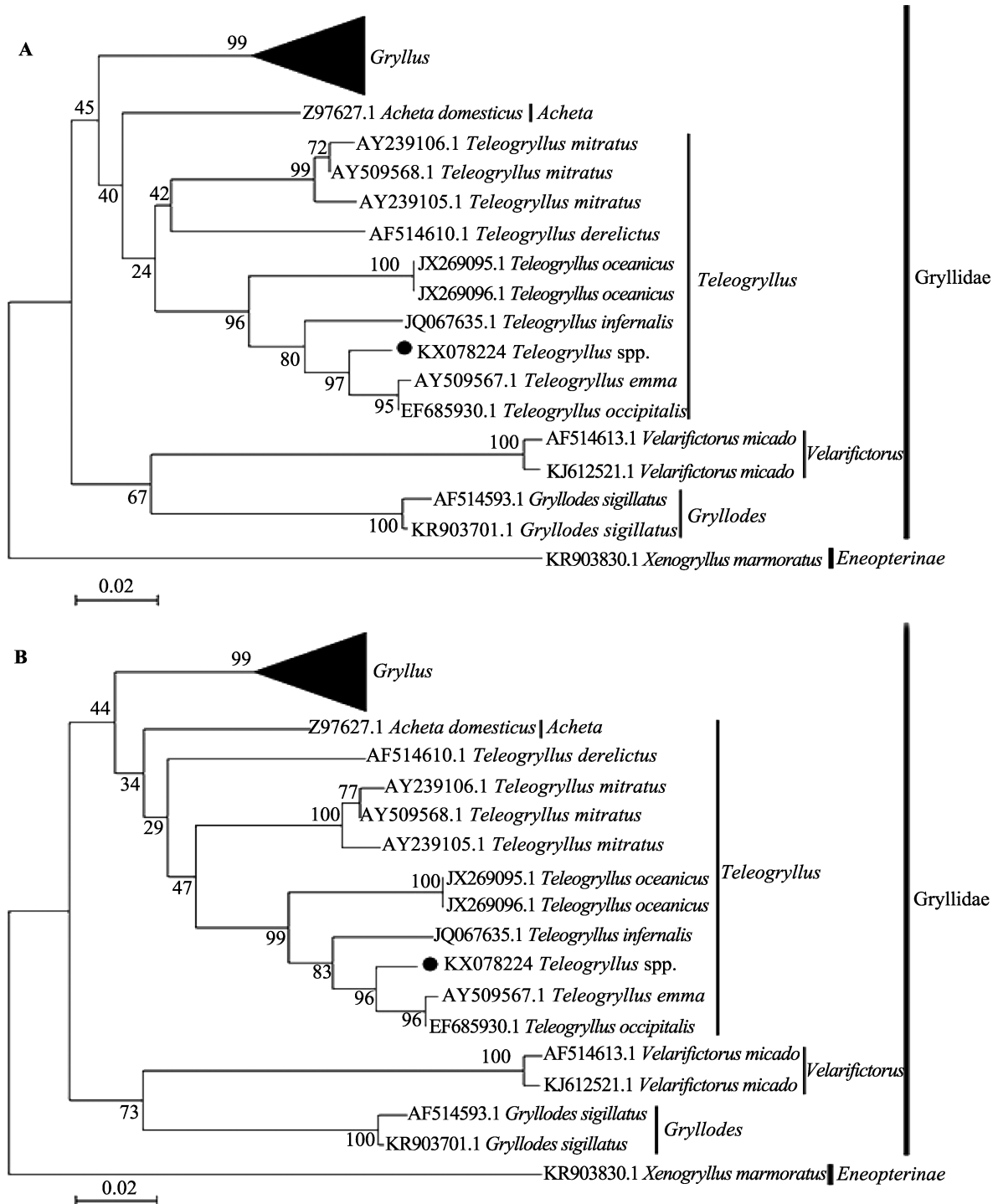


图 1 基于 23 个种的蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 构建的 ME 树 (A) 和 NJ 树 (B)

Fig. 1 The ME tree (A) and NJ tree (B) of 23 cricket species based on mtDNA-16S rRNA gene sequences

图中种类拉丁学名对应的中文名称同表 1。

The Chinese name in the Fig. 1 is the same as Table 1.

NJ 树和 ME 树所显示的拓扑结构基本类似。两个系统发生树都出现两个聚类簇, NJ 树显示:

(1) 灶蟋属 (*Gryllodes*) 与斗蟋属 (*Velarifictorus*) 优先聚合后与蟋蟀属的 15 个种汇合; (2) 黑脸油葫芦 (*Teleogryllus occipitalis*) 与黄脸油葫芦 (*Teleogryllus emma*) 优先聚合后于平顶山油葫芦聚合, 再依次与银川油葫芦 (*Teleogryllus infernalis*)、滨海油葫芦 (*Teleogryllus oceanicus*)、北京油葫芦 (*Teleogryllus mitratus*) 和黄褐油葫芦 (*Teleogryllus derelictus*) 聚合, 构成油葫芦属; ME 树显示: (1) 斗蟋属和灶蟋属聚合; (2) 黑脸油葫芦与黄脸油葫芦优先聚合后于平顶山油葫芦聚合, 再依次与银川油葫芦、滨海油葫芦、北京油葫芦和黄褐油葫芦聚合, 构成油葫芦属; 然后, 油葫芦属首先与家蟋聚合, 再与蟋蟀属的其他成员聚合。

2.2 蟋蟀肠道细菌宏基因组测序以及分析

2.2.1 宏基因组测序结果与 OUT 聚类分析 宏基因组测序获得原始数据, 去除 Barcode、两端 Primer 以及部分低质量序列后, 生成有效数据, 前中肠 (X1) 获得 21 799 条 reads, 平均长度 423.9 bp, 后肠 (X2) 获得 16 515 条 reads, 平均长度 406.6 bp。OUT 聚类结果: 一共聚类了 3 012 个 OUT, 前中肠 857, 后肠 2 155。

2.2.2 门水平的聚类分析 在门水平的分类分析表明, 超过 99% 的肠道细菌归属于变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes)。在前中肠中, 变形菌门占 50.65%, 厚壁菌门占 45.08%, 拟杆菌门占 3.65%; 在后肠中, 厚壁菌门占 60.53%, 拟杆菌门占 30.13%, 变形菌门占 8.9%。

2.2.3 属水平的聚类分析 在属水平的分类表明, 前中肠的细菌归属于 232 个属, 后肠的细菌归属于 152 个属。前中肠的细菌中数量最多的前 5 个是: *Lactococcus* (33.47%), *Pantoea* (21.50%), *Enterobacter* (15.47%), *Wolbachia* (9.47%), *Weissella* (5.34%); 后肠的细菌 top5 是: 未分类的瘤胃球菌科成员 (unclassified Ruminococcaceae) (30.07%), *Parabacteroides* (10.93%), *Incertae sedis* (9.74%), *Alistipes* (5.86%), *Bacteroides* (5.50%)。Dysgonomonas (4.91%)。门水平和属 (前 20 个) 水平的聚类分析详见图 2。蟋蟀肠道细菌的进化关系如图 3 所示。

2.2.4 蟋蟀肠道细菌多样性分析 Shannon 指数反映群落的多样性, ACE 指数和 Chao1 指数反映样品中群落的丰富度, Simpson 反映群落中优势种群的集中程度。因此, ACE 和 Chao1 指数越大, Simpson 指数越小, 表明样品中物种越

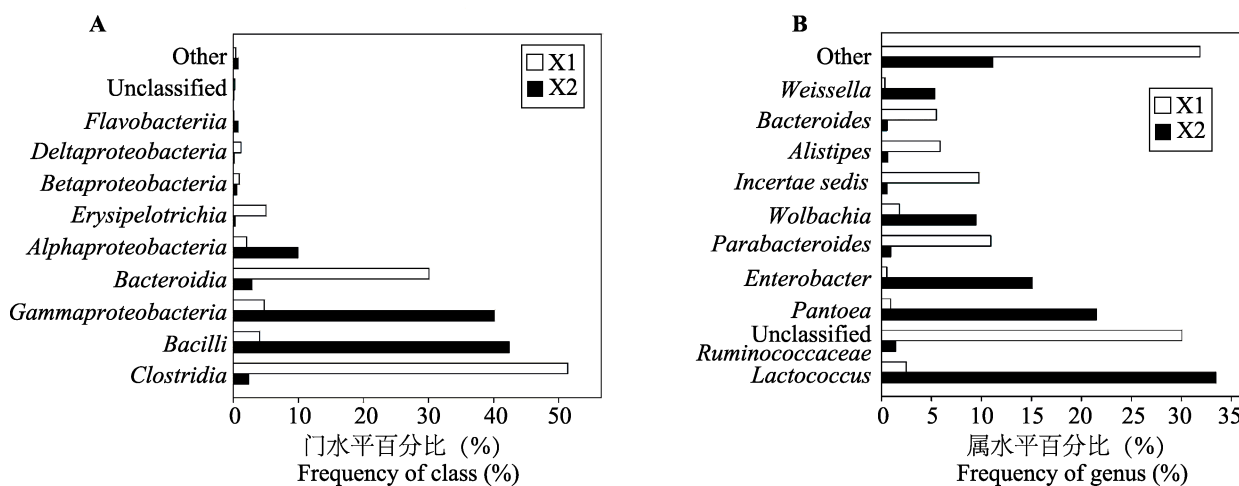


图 2 蟋蟀肠道细菌在门 (A)、属 (B) 等级的物种比例
Fig. 2 The proportions of the bacteria species in the intestine of cricket, class (A) and genus (B)

X1 代表蟋蟀前中肠; X2 代表蟋蟀后肠。
X1 means anterior midgut; X2 means posterior intestine.

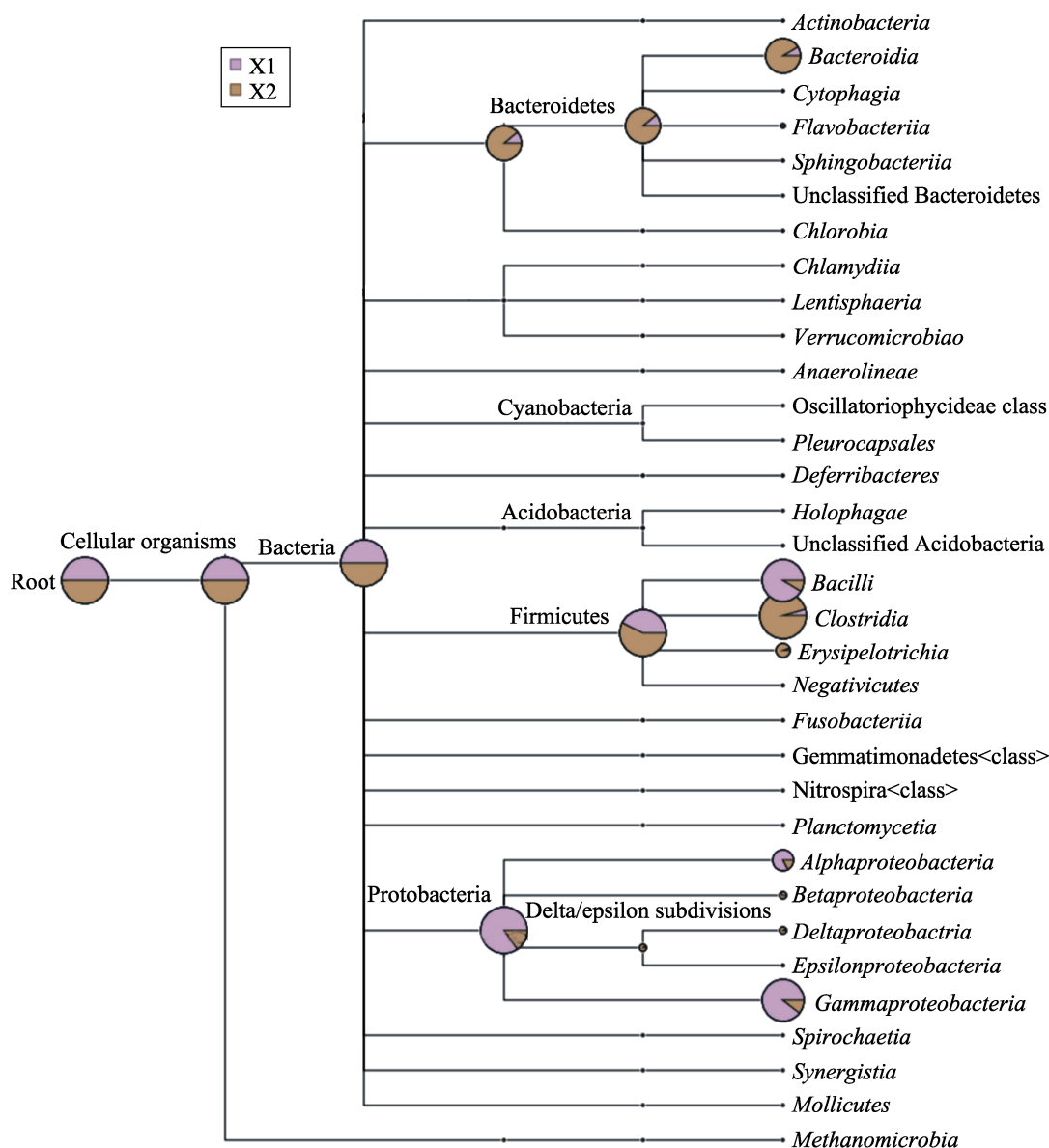


图 3 蟋蟀前中和后肠道细菌的物种系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the bacteria in the intestine of cricket

X1 代表蟋蟀前中肠；X2 代表蟋蟀后肠。

X1 means anterior midgut; X2 means posterior intestine.

丰富多样。由表 2 可知，相对于蟋蟀的前中肠，蟋蟀后肠的细菌种类有着较高的丰富度和多样性。

3 讨论

3.1 分子鉴定

斗蟋属与灶蟋属关系比较接近，这与田英芳和郑哲民（2002）、蒋国芳等（2004）及寇静和廉振民（2006）的研究结果类似。而蟋蟀属关系较为复杂（蒋国芳等，2004）。mtDNA-16S rRNA

分析的结果显示油葫芦属内的关系相对稳定，提示我们 mtDNA-16S rRNA 是油葫芦属内成员分子鉴定的有效工具。并且，NJ 树和 ME 树都将我们测序的样本归入了油葫芦属，黑脸油葫芦与黄脸油葫芦优先聚合后，再与平顶山油葫芦聚合，最后依次与银川油葫芦等聚合，系统发生树的结果提示我们平顶山油葫芦可能是介于银川油葫芦与黄脸油葫芦，黑脸油葫芦中间的一个新的种或者亚种，这一论断还需要进一步的研究。

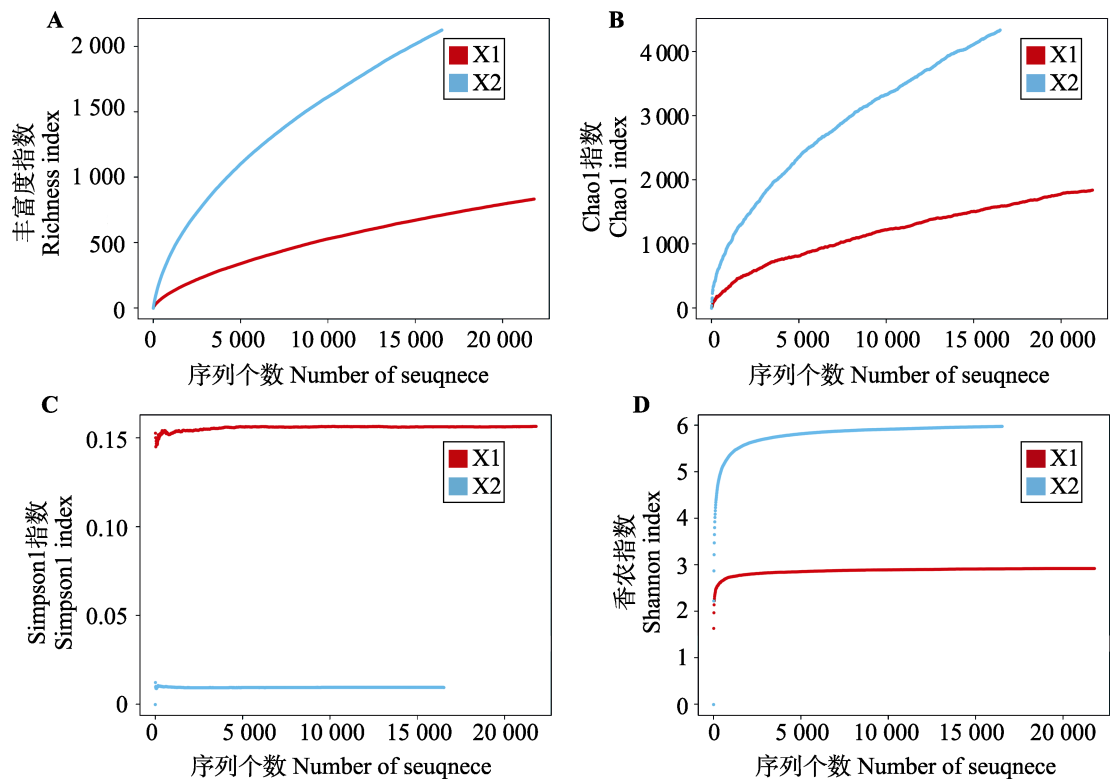


图 4 蟋蟀前中肠和后肠细菌 16S rRNA 多样性稀释度曲线
Fig. 4 Rarefaction curves generated for 16S rRNA from intestine of cricket

A. Richness 指数; B. Chao1 指数; C. Simpson 指数; D. Shannon 指数; X1 代表前中肠; X2 代表后肠。
A. Richness; B. Chao1; C. Simpson1; D. Shannon. X1 means anterior midgut; X2 means posterior intestine.

表 2 蟋蟀肠道细菌的 α -多样性指数统计
Table 2 Statistics of alpha indices of the bacterial in the intestine of cricket

样品 Sample	香农指数 Shannon index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index
前中肠 Anterior midgut	3.00	2 622	1 860	0.15
后肠 Posterior intestine	5.99	5 985	4 425	0.01

3.2 前中肠细菌多样性

在蟋蟀前中肠, 我们发现了: 第一, 超过 60% 的菌属与食物发酵相关, 包括乳球菌属 (33.47%), 泛菌属 (21.50%) 和魏斯菌属 (5.34%)。乳球菌 (*Lactococcus*, L), 是一种常见的兼性厌氧革兰氏阳性菌, 多见于乳制品和植物制品, 可以大量发酵碳水化合物并产生乳酸, 模式菌株为乳酸乳球菌。乳球菌通常具有加速食品酸化、增加食物营养及改善食物品质的作用, 是乳制品工业发酵的重要菌类。另外, 部分乳球菌可以引起人类感染, 是人类的致病菌 (李仲兴等, 2005)。泛菌属 (*Pantoea*), 广泛存在

于植物表面、种子、土壤和水中, 例如成团泛菌, 是腐生菌, 多年来一直被认为是植物的致病菌, 也可从动物和人的伤口、血和尿中分离到, 是人的条件致病菌 (符玉文等, 2011; 黄淑华等, 2014)。魏斯菌属 (*Weissella*), 通常存在于新鲜蔬菜、木薯、青贮饲料、可可豆、腊肠、泡菜、土壤等制品中, 多数菌种在植物发酵中起重要作用 (Comi and Iacumin, 2012; Hewitt *et al.*, 2004)。人或动物的临床材料中也有分离到魏斯氏菌的报道, 一般被视为非致病性的 (翁善钢, 2014)。第二, 还发现了大量的肠道正常菌群, 例如, 肠杆菌 (15.47%), 它们易于培养, 繁殖快, 广泛分布于自然界, 普遍存在于人和动物的肠道。

第三,还发现了大量的昆虫共生菌——沃尔巴克氏体(*Wolbachia*) (9.47%)。沃尔巴克氏体是立克次体目无形体科下的专性细胞内寄生的共生微生物,广泛存在于节肢动物和丝状线虫细胞质中,不仅可以引起宿主精卵细胞质不亲和(Cytoplasmic incompatibility, CI),孤雌生殖、雌性化、杀雄等生殖方面的改变,而且可以影响宿主的嗅觉、免疫和寿命等(Zheng *et al.*, 2011; Rances *et al.*, 2012)。研究表明,感染沃尔巴克氏体会增加蚊虫对登革热、黄热病、西尼罗河病毒、疟疾和细菌的抵抗力(Wong *et al.*, 2011)。宏基因组的数据显示在蟋蟀的体内存在大量的沃尔巴克氏体,这一发现提示我们蟋蟀的种群复杂性可能与大量的沃尔巴克氏体有关。

3.3 后肠细菌多样性

Santo Domingo (1998) 使用 16S rRNA 探针检测的方法,发现蟋蟀后肠拟杆菌门比例最大。Satokari 等(2001)采用荧光 16S rRNA 寡核苷酸探针的方法,发现蟋蟀的后肠微生物大部分(60%~80%)是真杆菌属,并且不同的日粮会改变蟋蟀的后肠微生物菌群结构。我们研究发现:第一,蟋蟀后肠占 30.07%的是未分类的瘤胃菌科(Ruminococcaceae)的细菌,它们属于厚壁菌门。在反刍动物方面的研究发现,瘤胃相关的微生物主要包括细菌、真菌原虫等,它们和瘤胃构成了降解植物细胞壁的高效系统。植物细胞壁干物质重的 60%~80%是纤维素、半纤维素和果胶,经过瘤胃的消化,这些物质转化为微生物蛋白、挥发性的脂肪酸等,最终被反刍动物利用(Dehority *et al.*, 1967; 刘晶, 2014)。在蟋蟀的肠道中发现大量未分类的瘤胃菌科的细菌,这一结果提示我们蟋蟀在消化植物细胞壁的过程中可能也很大程度地借助了微生物的作用,与蟋蟀的肠道一起形成了高效的降解植物细胞的系统,特别是对植物纤维素、半纤维素和果胶的降解。第二,还发现了一部分肠道正常菌群,*Parabacteroides* (10.93%)和拟杆菌属(*Bacteroides*)。 *Parabacteroides* (10.93%)是紫单胞菌科的成员,是常见的肠道微生物。人体肠道微生物、代谢组学方面的研究发现, *Parabacteroides* 与棕榈酰鞘磷脂、三肽和三核苷

酸负相关(Sinha *et al.*, 2016)。拟杆菌属(*Bacteroides*), 5.50%。正常寄居于人和动物的肠道、口腔、上呼吸道和生殖道,是正常菌群。第三,还发现了超过 20%的功能未知的菌属, *Incertae sedis* (9.74%), *Alistipes* (5.86%), *Dysgonomonas* (4.91%)。

3.4 前中肠和后肠细菌多样性的比较

在蟋蟀前中肠发现了近 2/3 的植物发酵相关的菌属,它们可能来源于蟋蟀生存的环境,同时参与了食物的酵解,这些细菌的存在可能帮助了蟋蟀对相关食物的消化;而在后肠发现了近 1/3 相关瘤胃菌科的菌属,这些细菌对植物纤维素、半纤维素和果胶的降解有帮助作用,也就是说后肠可能是蟋蟀降解和利用植物细胞壁的主要场所。另外,在前中肠和后肠都发现了大量的肠道正常菌群,这些细菌可能在维持蟋蟀肠道的正常功能等方面扮演了重要角色。

4 结论

蟋蟀在人类生活中扮演多种角色,与人类关系十分密切,同时本身含有丰富的肠道微生物资源,具有极高的科研与应用价值。本研究基于 mtDNA-16S rRNA 对平顶山油葫芦进行了初步的分子鉴定;初次使用宏基因组学的技术展示了蟋蟀肠道微生物的群落特征与多样性,发现蟋蟀的前中肠和后肠都含有丰富的细菌资源,而且这些细菌大多与植物性食物的消化有关。将来会有更多的研究来评价我们今天的工作,希望我们的研究为进一步开发和利用蟋蟀肠道微生物资源做出贡献。

致谢:本研究中宏基因组测序工作及部分数据分析得到苏州贝斯派生物科技有限公司的大力支持。

参考文献 (References)

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59(1): 143–169.
- Bakken LR, 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(6): 1482–1487.
- Chen DS, Si L, Li AZ, Zhao XF, Li YX, Cui SY, 2006. Farmland crickets produce harm characteristics and control measures. *Chinese Countryside Well-off Technology*, (2): 42–42. [陈德胜,

- 司俐, 李爱芝, 赵训福, 王桂香, 李玉雪, 崔圣宇, 2006. 农田蟋蟀发生危害特性及防治措施. 中国农村小康科技, (2): 42–42.]
- Chen TX, Ren DC, 2011. In ancient China to the observation and understanding of the cricket behavior during the period of the republic of China. *Study in the Natural Sciences*, 30(3): 345–356. [陈天嘉, 任定成, 2011. 中国古代至民国时期对蟋蟀行为的观察和认识. 自然科学史研究, 30(3): 345–356.]
- Claesson MJ, Orla OS, Qiong W, Janne N, Marchesi JR, Hauke S, O'Toole PW, 2008. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *Journal of Emergency Medicine*, 34(4): 397–400.
- Comi G, Iacumin L, 2012. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(47): 114–121.
- Dehority BA, Scott HW, Kowaluk P, 1967. Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, 94(3): 537–543.
- Edgar RC, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10): 996–998.
- Fu YW, Wang LL, Sun ZH, 2011. A case of *Pantoea* was isolated from cerebrospinal fluid. *Journal of Practical Medicine*, 27(8): 1475–1475. [符玉文, 王露露, 孙朝晖, 2011. 从脑脊液中分离出成团泛菌 1 例. 实用医学杂志, 27(8): 1475–1475.]
- Gewin V, 2006. Genomics: discovery in the dirt. *Nature*, 439(7075): 384–386.
- Hewitt SM, James D, Star RA, 2004. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *Journal of the American Society of Nephrology Jasn*, 15(7): 1677–1689.
- Huang SH, Chen L, Zhang CY, Gong B, 2014. Detection *Pseudomonas aeruginosa* and *Pantoea* bacteria in commercially available bottled drinking water. *The Chinese and Foreign Medical*, 33(5): 182–183. [黄淑华, 陈磊, 张春艳, 巩飏, 2014. 从市售桶装饮用水中同时检出铜绿假单胞菌和成团泛菌. 中外医疗, 33(5): 182–183.]
- Kou J, Lian ZM, 2006. Phylogenetic relationships of five genera based on partial sequences of COII gene(Orthoptera: Gryllidae). *Entomotaxonomia*, 28(2): 97–102. [寇静, 廉振民, 2006. 基于 mtDNA-CO II 基因部分序列探讨蟋蟀科五属的进化关系(直翅目: 蟋蟀科). 昆虫分类学报, 28(2): 97–102.]
- Jiang GF, Chen AH, Feng JY, 2004. Phylogenetic relationship of nine crickets based on partial sequences of 16S rRNA gene(Orthoptera: Gryllidae). *Entomotaxonomia*, 26(4): 249–254. [蒋国芳, 陈爱辉, 冯金叶, 2004. 九种蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 基因序列及其系统进化(直翅目: 蟋蟀科). 昆虫分类学报, 26(4): 249–254.]
- Jws D, 1998. Use of 16S rDNA community fingerprints to study cricket hindgut microbial communities. *Journal of General & Applied Microbiology*, 44(2): 119–127.
- Kellenberger E, 2001. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Rep.*, 2(1): 5–7.
- Li ZX, Zhang XH, Wang YX, 2005. The research progress of milk coccus and infection. *Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Foreign Medicalences*, 26(12): 928–931. [李中兴, 张新华, 王永祥, 2005. 乳球菌及其感染的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学, 26(12): 928–931.]
- Liu J, 2014. Feed pectin on rumen microbial flora structure and microbial protein synthesis. Doctoral dissertation. Huangzhou: Zhejiang University. [刘晶, 2014. 饲料果胶对瘤胃微生物菌群结构和微生物蛋白合成影响的研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Lou SH, Shang TR, 2008. The occurrence characteristics and the prevention and control technology of the farmland cricket. *Seed Industry Tribune*, (6): 33–33. [娄世花, 尚统锐, 2008. 农田蟋蟀的发生特点及防治技术. 种业导刊, (6): 33–33.]
- Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, Mccaughey MJ, Woese CR, 1996. The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acids Research*, 24(1): 82–85.
- Sinha R, Ahn J, Sampson JN, Shi J, Yu G, Xiong X, Hayes RB, Goedert JJ, 2016. Fecal microbiota, fecal metabolome, and colorectal cancer interrelations. *PLoS ONE*, 11(3): e0152126
- Rances E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL, 2012. The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathog*, 8(2): e1002548. doi:10.1371/journal.ppat.1002548.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406–425.
- Santo Domingo JW, 1998. Use of 16S rDNA community fingerprints to study cricket hindgut microbial communities. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44(2): 119–127.
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, Vos WM, 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied & Environmental Microbiology*, 67(2): 504–513.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Robinson CJ, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied & Environmental Microbiology*, 75(23): 7537–7541.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Hong L, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.
- Tian YF, Zheng JM, 2002. Random amplified polymorphic DNA in five species of crickets (Orthoptera: Grylloidea). *Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 30(2): 91–93. [田英芳, 郑哲民, 2002. 5 种蟋蟀的 RAPD 研究初报(直翅目: 蟋蟀总科). 陕西师范大学学报: 自然科学版, 30(2): 91–93.]
- Wong SG, 2014. *Weissella viridescens* in meat products. *Meat Industry*, (2): 40–42. [翁善钢, 2014. 肉制品中的绿色魏斯氏菌. 肉类工业, (2): 40–42.]
- Wong ZS, Hedges LM, Brownlie JC, Johnson KN, 2011. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(9): e25430. doi:10.1371/journal.pone.0025430.
- Zheng Y, Wang JL, Liu C, Wang CP, Walker T, Wang YF, 2011. Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila*. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-12-595.