

黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder) 肠道共生古菌的系统发育分析

石玉¹, 张燕鸿¹, 杨红^{1,2*}

(华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079)

(华中师范大学昆虫所, 农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079)

摘要: 【目的】利用非培养法对黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder) 肠道共生古菌进行系统发育分析。【方法】采用古菌 16S rDNA 通用引物以黑胸散白蚁全肠 DNA 为模板扩增共生菌的 16S rDNA 并建立基因文库, 对得到的基因序列进行系统发育分析。【结果】从黑胸散白蚁肠道得到 5 个不同的 16S rDNA 序列, 它们之间的相似性为 93.2% ~ 99.2%, 系统发育分析表明这 5 个 16S rDNA 序列代表的克隆分别与来源于黑胸散白蚁近缘种 栖北散白蚁和北美散白蚁肠道中的甲烷短杆菌克隆或分离株的亲缘关系最近。【结论】黑胸散白蚁肠道共生古菌为甲烷短杆菌。

关键词: 黑胸散白蚁; 肠道; 共生古菌; 系统发育分析

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209 (2009) 12-1655-05

白蚁是节肢动物中少数几种能向环境中释放甲烷的昆虫, 这些甲烷是由白蚁肠道内的共生甲烷菌产生的。不同种类白蚁向体外释放的甲烷量不同。一般来说, 土食性和培菌类白蚁比木食性和草食性白蚁释放的甲烷量大^[1]。考虑到自然界有 2000 多种白蚁分布于从南纬 45°到北纬 45°的广大地区, 尤其在热带和亚热带森林白蚁群体的数量极其庞大, 人们估测白蚁每年向自然界释放的甲烷占大气中甲烷总量的 5% ~ 40%^[1-3]。尽管精确的数据有待考证, 白蚁释放的甲烷和二氧化碳仍被认为是温室气体的重要来源之一。

无论是高等白蚁还是低等白蚁肠道内均存在着不同梯度的氢分压, 说明氢是白蚁代谢中的重要中间产物^[4]。在不同白蚁体内, 参与 H₂ 的消耗和 CO₂ 还原的既有甲烷菌, 也有同型乙酸菌^[5]。甲烷菌在不同种类白蚁中均有发现。已有的研究表明, 低等白蚁中的共生古菌大都属于甲烷杆菌目的甲烷

短杆菌属 (*Methanobrevibacter*); 而高等白蚁体内的共生古菌大都属于产甲烷菌, 如甲烷八叠球菌目的甲烷微球菌属 (*Methanimicrococcus*), 仅有少数属于非产甲烷古菌, 如: 广古菌门热原体纲的热原体属 (*Thermoplasma*) 和泉古菌门 (*Grenarchaeota*) 的古菌^[6]。从低等白蚁, 北美散白蚁 (*Reticulitermes flavipes*) 肠道中分离的三株甲烷菌均能以氢为电子供体将二氧化碳还原为甲烷^[7-8]。以基于 16S rRNA 基因的系统发育分析也表明在其它几种低等白蚁如栖北散白蚁 (*Reticulitermes speratus*) 和高山原白蚁 (*Hodotermopsis sjoestedti*) 肠道中均存在着甲烷短杆菌, 这些甲烷短杆菌与自然界其它环境中的甲烷短杆菌在系统发育上明显不同^[9-10]。作为低等木食性白蚁肠道共生微生物, 甲烷菌在白蚁代谢过程中的作用尚待进一步研究。

黑胸散白蚁 (*Reticulitermes chinensis* Snyder) 是广泛分布于我国的一种低等木食性白蚁, 有关其肠道

基金项目: 国家自然科学基金 (30570034)

* 通信作者。Tel: +86-27-67862431; Fax: +86-27-67867226; E-mail: jhyang@mail.ccnu.edu.cn

作者简介: 石玉 (1983-), 女, 山东人, 硕士, 从事微生物分子生态学研究。E-mail: shiy2005@126.com

收稿日期: 2009-05-25; 修回日期: 2009-09-09

内共生微生物多样性的研究尚未见报道。本文报道了用非培养法对其肠道内古菌多样性进行分析的初步结果,为进一步阐明共生古菌在白蚁体内的生理作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 白蚁的采集和饲养 黑胸散白蚁采自武汉市狮子山树林内,实验室条件下避光饲养于盛有松木的塑料盒中,盒盖上留有通风孔。选取工蚁为实验材料。

1.1.2 主要试剂和仪器 :磷酸缓冲液 PBS (137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 10 mmol/L Na_2HPO_4 ; 2 mmol/L KH_2PO_4 , PH7.4); PCR 引物的合成和测序由北京利嘉泰成科技有限公司完成; Taq 酶、dNTP 均购自天源公司; 克隆载体为 pGEM-T easy Vector (Promega 公司); 限制性内切酶 *Msp* I 和 *Afa* I 为 TaKaRa 公司产品。显微镜为 Nikon 公司的 E-400 型荧光显微镜, PCR 仪为 Biorad 公司的 Peltier Thermal Cycler。

1.2 甲烷菌的荧光原位显微观察

黏附在黑胸散白蚁后肠上皮甲烷菌的观察,参考 Leadbetter^[7]的实验方法但略有改进:用尖头镊子将白蚁肠道拉出并放在滴有 PBS 的载玻片上,用刀片纵向切开后肠。解剖开的后肠用 PBS 冲洗 3 次,再把后肠放入含 1 mL PBS 的 1.5 mL 离心管中,漩涡振荡 3 次,共 30 秒。然后,把洗过的后肠浸泡到含新鲜 PBS 的 1.5 mL 离心管中,4℃ 冰箱过夜。从离心管中取出一条后肠置于载玻片上,使后肠的肠腔面向上,盖上盖玻片,用 NIKON E-400 荧光显微镜 (F420) 观察。

1.3 白蚁全肠 DNA 的提取

白蚁全肠 DNA 的抽提方法如下:选取工蚁 25 条,表面依次用 70% 乙醇、无菌蒸馏水清洗,用尖头镊子拉出白蚁肠道,放入含有 1 mL 裂解液 (含 0.1% SDS 的 TE 缓冲液) 的 EP 管中,然后用匀浆棒将肠道组织匀浆,将匀浆液在 65℃ 水浴和液氮之间进行 5 次冻融循环,加入 10 μg RNA 酶,37℃ 下温浴 20 min,再加入蛋白酶 K (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 50℃ 水浴过夜。次日,用等体积的酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25:24:1) 和氯仿/异戊醇 (体积比为 24:1) 进行 DNA 抽提,经异丙醇沉淀和 70% 冰乙醇洗涤后加入 20 μL 的超纯水溶解 DNA。

1.4 甲烷菌 16S rDNA 的扩增

采用古菌 16S rRNA 基因通用引物 Ar109F (5'-AC-

KGCTCAGTAACACGT-3') 和 Ar912R (5'-CTCCCCGC-CAATTCCTTTA-3')^[11] 进行 PCR 扩增。PCR 采用 50 μL 反应体系,反应条件 94℃ 5 min 94℃ 1 min 52℃ 1 min 72℃ 1.5 min 30 个循环 72℃ 7 min。

1.5 甲烷菌 16S rRNA 基因文库的建立

PCR 产物纯化后连接到载体 pGEM-T easy Vector 上,甲烷菌 16S rRNA 基因文库的建立和重组子的筛选参照文献 [15]。对含有正确插入序列的克隆用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I 进行核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA), 两种酶切后显示相同酶切图谱的克隆视为相同的 ARDRA 型^[21]。从具有相同 ARDRA 型的克隆中选取 1~2 个克隆测序。本研究得到的甲烷菌 16S rRNA 基因在 GenBank 的登录号为 FJ842693-FJ842697。

1.6 序列分析与系统发育树的构建

将得到的序列输入到 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/html>), 利用 CHECK CHIMERA 程序对所测得的序列进行在线检测,除去嵌合体序列。然后在 NCBI 中利用 BlastN 搜索同源性较高的已知序列,将得到的甲烷菌序列和搜索到的同源序列用 ClustalX 1.83 进行多重比对^[31]。再用 MEGA 4.0 中的邻接法 (neighbor-joining method)^[41] 构建系统发育树,数据自展重抽样次数 500 次,以 *Methanosarcina barkeri* 为系统发育树的根。

2 结果和分析

2.1 甲烷菌的荧光原位显微观察

据报道,甲烷菌能在荧光显微镜 (UV) F420 滤片下产生蓝绿色自发荧光^[7]。显微观察表明,在黑胸散白蚁后肠肠壁上皮分布有大量的短杆状菌,还有少量呈稍微弯曲的杆状,如图 1 所示。它们在荧光显微镜 UV F420 激发下自发产生蓝绿色荧光。黑胸散白蚁肠壁上皮这些能产生自发荧光的共生菌的形态与分布于其它几种散白蚁如北美散白蚁^[7]、桑特散白蚁 (*R. santonensis*)^[5] 以及栖北散白蚁后肠甲烷菌的形态相类似^[6],据此推测这些肠壁共生菌为甲烷菌。

2.2 古菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

利用古菌 16S rRNA 基因通用引物,以黑胸散白蚁肠道总 DNA 为模板进行古菌 16S rDNA 的 PCR 扩增,得到的产物约为 800 bp,与预期的大小一致。

2.3 古菌 16S rDNA 文库的建立与克隆的限制性酶切分析

古菌 16S rRNA 基因的 PCR 产物经纯化后连接

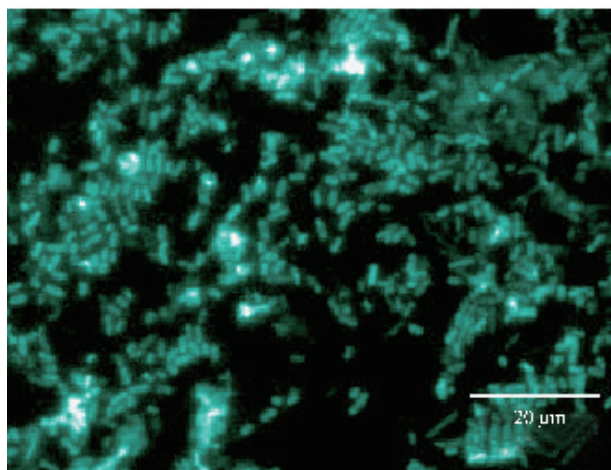


图1 黑胸散白蚁后肠肠壁上皮表面能产生自发荧光的共生菌 (荧光显微镜 F420)

Fig. 1 Autofluorescent cells attached to the hindgut epithelium of *Reticulitermes chinensis* Snyder, as shown by F420 epifluorescence microscopy.

到 pGEM- T easy 载体上构建基因文库。从文库中随机挑取了 75 个白色菌落。以 M13 为引物对随机挑取的克隆进行 PCR 扩增,经电泳检测,共有 60 个为含有正确插入序列的克隆。用限制性内切酶 *Afa* I (图 2-A) 和 *Msp* I (图 2-B) 分别对这 60 个阳性克隆进行酶切,根据核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (ARDRA),将这 60 个阳性克隆分为 9 个不同的 ARDRA 型。

2.4 黑胸散白蚁肠道共生古菌的系统发育分析

从这 9 种 ARDRA 型中随机挑取 1-2 个克隆测序,其中有的克隆所得到的序列相似性大于 99.5% 视为相同克隆。最终得到 5 个不同的古菌 16S rRNA 基因,相似性为 93.2% ~ 99.2%。Blast 分析显示,黑胸散白蚁肠道共生古菌 16S rRNA 基因与来自不同低等白蚁肠道内甲烷短杆菌克隆或分离株的 16S rDNA 序列最为接近,相似性达到 93.2% ~ 99.7%,

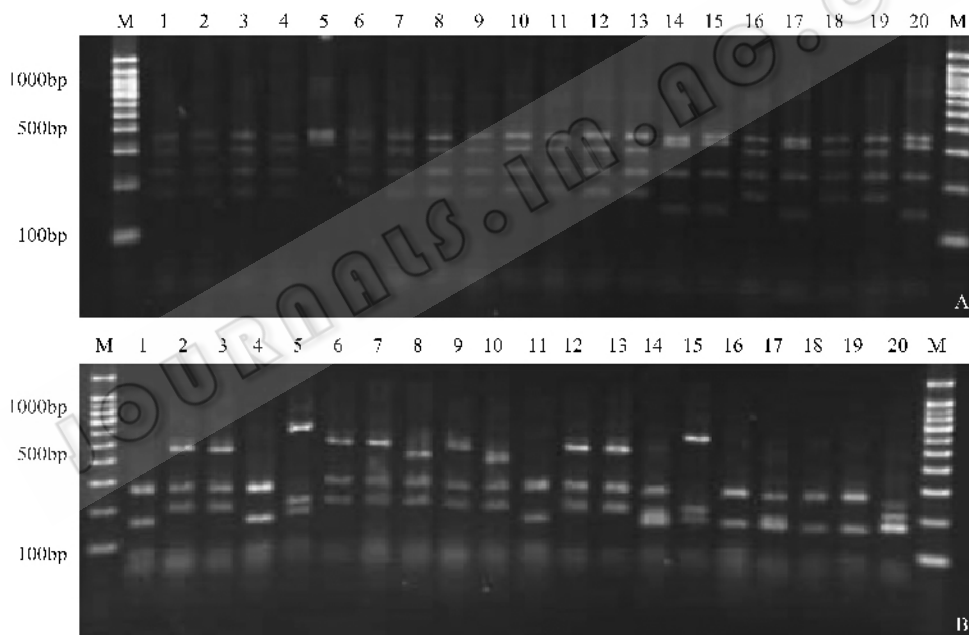


图2 黑胸散白蚁肠道共生古菌 16S rDNA PCR 产物的 *Afa* I (A) 和 *Msp* I (B) 酶切图谱

Fig. 2 ARDRA profile of archaea clones from *R. chinensis* digested with *Afa* I (A) and *Msp* I (B).

而与来自其它环境甲烷短杆菌 16S rDNA 序列的相似性为 92% ~ 98%。初步确定在黑胸散白蚁肠道内有甲烷短杆菌。在系统发育树上 (图 3),黑胸散白蚁甲烷短杆菌克隆与来源于不同低等白蚁肠道内的甲烷短杆菌形成独立的簇,说明白蚁肠道内的甲烷短杆菌与自然界其它环境如牛瘤胃中的甲烷短杆菌明显不同。

3 讨论

在不同白蚁肠道内均发现有古菌共生,系统发

育分析表明,白蚁肠道中的古菌主要是产甲烷菌,隶属于甲烷杆菌目,甲烷八叠球菌目和甲烷微菌目,仅有少数是非产甲烷菌,如:在栖北散白蚁和土食性白蚁 *Cubitermes orthognathus* 中曾发现有热原体纲的热原体^[1]。在土食性白蚁肠道中共生古菌的种类较多。对土食性白蚁 *Cubitermes orthognathus* 的研究表明,其肠道内大多数古菌属于甲烷八叠球菌目,甲烷菌目,甲烷杆菌目和热原体目,其中甲烷杆菌目中有甲烷短杆菌,它们随肠道 pH 等生理条件的不同而分布在不同部位,此外,在该白蚁中还首次发现有泉

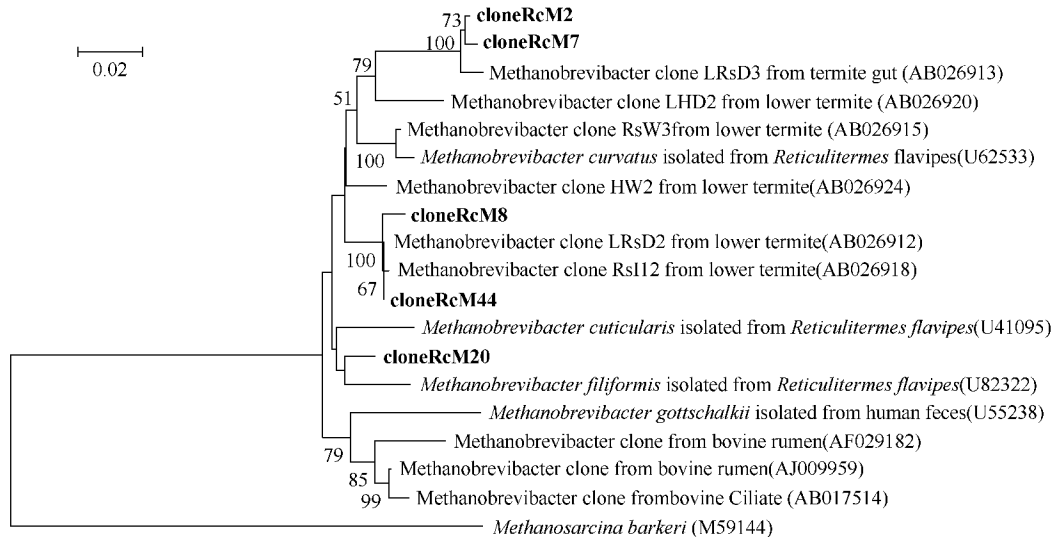


图3 基于16S rDNA的黑胸散白蚁肠道共生甲烷菌的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences of the symbiotic methanogens in the gut of *Reticulitermes chinensis* Snyder. Sequences obtained in this study are shown in bold. The 16S rDNA sequence of *Methanosarcina barkeri* (M59144) was used as an outgroup to root the tree. The tree was constructed by neighbor-joining method of Mega 4.0. Bootstrap values (500 replicates) higher than 50% were indicated. The scale bar indicated 2% sequence divergence.

古菌门 (*Crenarchaeota*) 的古菌^[8]。对一种培菌类白蚁,大白蚁 *Macrotermes subhyalinus* 的研究发现,其肠道内共生古菌主要为甲烷八叠球菌^[9]。对不同低等木食性白蚁,如:栖北散白蚁^[7],高山原白蚁^[1],台湾乳白蚁 (*Coptotermes formosanus*) 和达尔文澳白蚁 (*Mastotermes Darwiniensis*)^[10] 的研究表明,它们肠道中共生古菌大都属于甲烷杆菌目甲烷短杆菌属。这些研究说明,白蚁肠道内共生古菌的种类与白蚁的食性,营养特点,肠道生理条件等诸多因素有关。本研究得到了5个古菌克隆约800bp的16S rDNA基因序列,系统发育分析表明它们与来源于不同低等木食性白蚁的甲烷短杆菌在系统发育上最为接近,初步推断在黑胸散白蚁肠道内有甲烷短杆菌共生。其中,克隆 RcM2, RcM7 与栖北散白蚁鞭毛虫 *Dinenympha parva* 的共生甲烷菌克隆 LRSD3 的16S rDNA 相似性分别为99.1%和98.5%;克隆 RcM8 和 RcM44 与栖北散白蚁肠壁上的甲烷菌克隆 RsI12 的16S rDNA 相似性达到99.1%和99.7%;而克隆 RcM20 与北美散白蚁甲烷短杆菌 *Methanobrevibacter filiformis* 分离株的16S rDNA 相似性为97.4%。低等木食性白蚁肠道内共生甲烷菌大多分布于肠壁,也有的为鞭毛虫共生菌^[6],黑胸散白蚁肠道共生甲烷菌在肠道内的分布与功能尚待进一步研究。

Dighe 等人根据对已知120个甲烷短杆菌的54个代表克隆的16S rDNA 系统发育分析,将甲烷短杆菌属划分为7个群,其中4个群为白蚁肠道共生甲烷菌,有几种甲烷短杆菌是从北美散白蚁肠道中分离得到的。这些甲烷短杆菌在系统发育上区别于自

然界其它环境如瘤胃,动物粪便来源的甲烷短杆菌^[10],说明白蚁肠道是自然界一个重要的甲烷菌资源库。进一步对白蚁肠道共生甲烷菌开展深入研究,对开发和利用甲烷菌资源具有积极的意义。

参考文献

- [1] Brauman A, Kane MD, Labat M, et al. Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science*, 1992, 257 (9): 1384 - 1387.
- [2] Martius C, Wassmann R, Thein U, et al. Methane emission from wood-feeding termites in Amazonia. *Chemosphere*, 1993, 26 (1-4): 623 - 632.
- [3] Hackstein JHP, Stumm CK. Methane production in terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 1994, 91: 5441 - 5445.
- [4] Brune A. Symbiotic associations between termites and prokaryotes//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The Prokaryote* (Vol. 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology). 3rd eds. New York: Springer, 2006: 439 - 474.
- [5] 杨红, 彭建新, 洪华珠, 等. 低等白蚁肠道共生微生物的多样性及功能. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46 (3): 496 - 499.
- [6] Ohkuma M. Termite symbiotic system: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61: 1 - 9.
- [7] Leadbetter JR, Breznak JA. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Applied and*

- Environmental Microbiology* ,1996 62 (10) 3620–3631.
- [8] Leadbetter JR ,Crosby LD ,Breznak A. *Methanobrevibacter filiformis* sp. nov. ,a filamentous methanogen from termite hindguts. *Archives of Microbiology* ,1998 ,169 287–292.
- [9] Ohkuma M ,Noda S ,Kudo T. Phylogeny of symbiotic methanogens in diverse termites. *FEMS Microbiology Letters* ,1999 ,171 :147–153.
- [10] Shinzato N ,Matsumoto T ,Yamaoka I ,et al. Methanogenic symbionts and the locality of other host lower termites. *Microbes and Environments* 2001 ,16 (1) 43–47.
- [11] Grosskopf R ,Janssen PH ,Liesack W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 64 (3) 960–969.
- [12] Yang H ,Schmitt-Wagner D ,Stingl U , et al. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environmental Microbiology* 2005 ,7 (7) 916–932.
- [13] Thompson JD ,Gibson TJ ,Plewniak F ,et al. The CLUSTAL X windows interface :flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* ,1997 25 (24) 4876–4882.
- [14] Kumar S ,Tamura K ,Nei M. MEGA3 :Integrated software for molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* ,2004 ,5 (2) :150–163.
- [15] 杨红. 木食性散白蚁肠道共生细菌的区系结构和多样性. 华中师范大学. 博士论文. 2004.
- [16] Tokura M ,Ohkuma M ,Kudo T. Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiology Ecology* 2000 33 233–240.
- [17] Shinzato N ,Matsumoto T ,Yamaoka I ,et al. Phylogenetic diversity of symbiotic methanogens living in the hindgut of the lower termite *Reticulitermes speratus* analyzed by PCR and in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* ,1999 65 (2) 837–840.
- [18] Friedrich MW ,Schmitt-Wagner D ,Lueders T ,et al. Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001 67 (10) 4880–4890.
- [19] Brauman A ,Dore J ,Eggleton P , et al. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiology Ecology* 2001 35 27–36.
- [20] Dighe AS ,Jangid K ,González JM ,et al. Comparison of 16S rRNA gene sequences of genus *Methanobrevibacter*. *BMC Microbiology* 2004 4 (1) 20. doi :10.1186/1471-2180-4-20.

Phylogenetic analysis of symbiotic archaea in the gut of *Reticulitermes chinensis* Snyder

Yu Shi¹ ,Yanhong Zhang¹ ,Hong Yang^{1,2*}

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology ,College of Life Sciences ,Central China Normal University ,Wuhan 430079 ,China)

(Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology ,Ministry of Education ,Institute of Entomology ,Central China Normal University ,Wuhan 430079 ,China)

Abstract : [Objective] To analyze the phylotypes of symbiotic archaea in the gut of *Reticulitermes chinensis* Snyder by using non-cultivating method. [Methods] We amplified 16S rRNA genes of the symbiotic archaea from the DNA extract of the whole gut with the universal archaeal 16S rDNA primer. A clone library of archaeal 16S rDNA was established and selected clones were sequenced and phylogenetically analyzed. [Results] Five 16S rDNA sequences with the similarity between 93.2% and 99.2% to each other were obtained from *Reticulitermes chinensis* Snyder. Phylogenetic analysis showed that the five clones were clustered with *Methanobrevibacter* clones or isolates obtained from *Reticulitermes speratus* and *Reticulitermes flavipes*. [Conclusion] The results showed that symbiotic archaea in the gut of *Reticulitermes chinensis* were affiliated with *Methanobrevibacter*.

Keywords : *Reticulitermes chinensis* Snyder ; gut ; symbiotic archaea ; phylogenetic analysis

(本文责编:王晋芳)