

# 台湾乳白蚁肠道鞭毛虫群落结构及 三种研究方法的比较

谢磊, 刘宁, 黄勇平, 王倩\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所昆虫发育与进化生物学重点实验室, 上海 200032)

**摘要:** 大量鞭毛虫栖息在低等白蚁肠道内, 是白蚁赖以生存的共生微生物。不同种类的鞭毛虫共同作用形成了一套降解食物的系统, 为宿主提供营养和能量。研究鞭毛虫群落结构是揭示其各组成种类生理功能的基础。利用形态特征进行物种鉴定受鞭毛虫生长发育阶段、样品制备方法等多种因素的影响, 而基于分子标记的分子生物学方法能不受这些因素的制约来研究复杂的微生物群落。本研究结合形态特征鉴定和分子生物学方法研究台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* 肠道鞭毛虫群落结构, 并对这些方法进行了比较。通过光学显微镜和扫描电子显微镜进行形态观察鉴定, 确定了台湾乳白蚁肠道内的 3 种鞭毛虫, 分别为伪披发虫 *Pseudotriconympha grassii*、全鞭毛虫 *Holomastigotoides mirabile* 和旋披发虫 *Spirotrichonympha leidy*。18S rDNA 文库限制性片段长度多态性分析较形态鉴定能够反映群落更复杂的物种多样性。利用光学显微镜进行细胞计数较 18S rDNA 文库克隆数能更准确地反映各种鞭毛虫数量, 每头工蚁肠道内平均含伪披发虫  $780 \pm 179$  头, 全鞭毛虫  $1\,630 \pm 391$  头, 旋披发虫  $2\,950 \pm 1\,003$  头。本研究建立了光学显微镜形态鉴定和 18S rDNA 分子标记相结合调查鞭毛虫多样性和数量的方法, 为进一步研究白蚁肠道共生生物的功能奠定了基础。

**关键词:** 鞭毛虫; 台湾乳白蚁; 群落结构; 形态鉴定; 分子标记; 18S rDNA; 限制性片段长度多态性

中图分类号: Q959.1; Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)10-1140-07

## Flagellate community structure in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) and a comparison of three study methods

XIE Lei, LIU Ning, HUANG Yong-Ping, WANG Qian\* (Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** A large number of flagellates live in the intestine of lower termites, which is vital for the survival of host termites. Different species of flagellates form a food digestion system to provide nutrients and energy for the host. Studies on the community structure of flagellates will provide the basis for elucidating the physiological functions of each member. Species identification based on morphological characteristics is influenced by the flagellate growth and developmental stages, sample preparation methods and other factors, but molecular biological methods based on molecular markers can avoid these drawbacks in studying complex microbial communities. In this study, the community structure of flagellates in the gut of *Coptotermes formosanus* was investigated with molecular biological methods combining with morphological characteristics. Three methods were also compared in studying community structure. Three species of flagellates (*Pseudotriconympha grassii*, *Holomastigotoides mirabile*, and *Spirotrichonympha leidy*) were identified by optical and scanning electron microscopic observation. Compared with morphological identification, 18S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis can reveal more species diversity. Cell counting under optical microscopy is more accurate than 18S rDNA analysis in investigating the amount of each flagellate. The average number of flagellates per termite worker was  $780 \pm 179$  for *P. grassii*,  $1\,630 \pm 391$  for *H. mirabile*, and  $2\,950 \pm 1\,003$  for *Spirotrichonympha leidy*. This study established a method of combining optical microscopy observation with 18S rDNA analysis to investigate intestinal flagellate community, which is the foundation to clarify the biological functions of the gut symbionts.

**Key words:** Flagellate; *Coptotermes formosanus*; community structure; morphological identification; molecular marker; 18S rDNA; RFLP

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900150; 31172153); 上海市自然科学基金项目(09ZR1436900)

作者简介: 谢磊, 男, 1983 年生, 湖南长沙人, 博士研究生, 研究方向为昆虫及其肠道微生物共生关系, E-mail: xielei@sippe.ac.com

\* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 021-54924324; E-mail: wangqian@sippe.ac.cn

收稿日期 Received: 2011-05-12; 接受日期 Accepted: 2011-09-01

白蚁是等翅目的社会性昆虫,分为7个科。根据白蚁肠道内是否含有鞭毛虫,可将其分为低等白蚁和高等白蚁两类,7个科中有6个科的白蚁属于低等白蚁(Kambhampati and Eggleton, 2000)。台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* 是属于鼻白蚁科的低等白蚁,在漫长的进化过程中白蚁与其肠道微生物形成了密切的共生关系。白蚁为肠道微生物提供稳定的食物来源和肠道内环境作为栖息地,反之肠道微生物为宿主提供营养和能量(陈虹等, 2005; 杨红等, 2006)。鞭毛虫的存在对白蚁的生存至关重要,去除了鞭毛虫的白蚁不能利用纤维素类物质作为食物,在10~20 d内即死亡(Cleveland, 1924)。研究证实鞭毛虫的生理功能主要有降解纤维素、发酵产生乙酸以及通过鞭毛虫细胞内的细菌为白蚁提供含氮物质(杨天赐等, 2006; 曾文慧等, 2010)。

大多数从低等白蚁肠道内发现的鞭毛虫特异地共生于白蚁和木食性蟑螂肠道内, Yamin (1979) 根据形态特征从205种低等白蚁肠道中鉴定了434种鞭毛虫,并将这些鞭毛虫分为3类,即毛滴虫目(Trichomonadida)、超鞭虫目(Hypermastigida)和锐滴虫目(Oxymonadida)。在低等白蚁容量不到1  $\mu\text{L}$  的后肠中,鞭毛虫的总体积可以占到后肠容量的90%,数量可以达到  $3.3 \times 10^3 \sim 13 \times 10^3$  头(Lai *et al.*, 1983; Yoshimura, 1995)。尽管白蚁肠道内含有大量的鞭毛虫,但大部分鞭毛虫至今还不能进行体外培养,阻碍了对它们的深入研究。尽管早在一个世纪前就开始对白蚁肠道鞭毛虫种类进行了研究,但是大部分研究集中在发现和描述鞭毛虫新种,而缺乏把这些鞭毛虫进行系统地分类。其中一些对鞭毛虫形态特征的描述也不尽详细,对物种鉴定造成了一些不便(Cleveland, 1923)。同一种鞭毛虫因其处于不同的生长发育阶段在形态上差异明显,也对其物种多样性研究造成困难。处于不同时期的细胞具有不同的大小,例如伪披发虫 *Pseudotrichonympha grassii* 是台湾乳白蚁肠道内体型最大的鞭毛虫,其细胞长度范围从150~300  $\mu\text{m}$  不等,宽度也在50~120  $\mu\text{m}$  范围内(Lai *et al.*, 1983; Yoshimura, 1995)。其次,在不同的生理状况下(如分裂生殖时)鞭毛虫也具有不同的细胞形态。用不同的缓冲液处理鞭毛虫进行观察时,盐浓度和样品制备方法也可能改变一些形态特征。这些因素造成了通过形态特征鉴定鞭毛虫的不便。

近年来分子生物学方法在生态学领域的应用为研究鞭毛虫提供了一种非培养且不依赖形态特征的

新途径,增强了我们解析这种复杂微生物群落的能力。分子生物学方法具有灵敏度高、不需要活体样本、不需要分离培养并且可以获得物种特异基因信息的特点(Medlin and Kooistra, 2010)。用于生态学研究分子标记主要包括核糖体小亚基(真核生物为18S rDNA,原核生物为16S rDNA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、烯醇化酶、 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白(Gerbod *et al.*, 2004; Ohkuma *et al.*, 2007)。鞭毛虫18S rDNA基因因其高度不保守性,广泛地应用于鞭毛虫分子生态研究中(Ohkuma *et al.*, 2007)。通过PCR的方法从微生物总DNA中扩增出该基因片段,再结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP)或焦磷酸测序等分子生物学方法,18S rDNA能够揭示微生物群落的物种多样性和相对数量(Nakajima *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006; Amaral-Zettler *et al.*, 2009; Stoeck *et al.*, 2009; Husseneder, 2010)。

Ohkuma等(2000)利用显微操作从台湾乳白蚁 *C. formosanus* 肠道中分离出单头鞭毛虫作为模板并扩增了其18S rDNA序列,构建了它们之间的进化关系,Noda等(2007)用同样方法获得的序列证明了白蚁和鞭毛虫之间存在共进化关系。虽然在低等白蚁中有通过18S rDNA序列比对来研究鞭毛虫系统发生和系统进化关系的报道(Keeling *et al.*, 1998; Ohkuma *et al.*, 1998),但至今为止还没有应用分子标记解析白蚁肠道鞭毛虫群落结构的相关研究。

为了比较光学显微镜形态鉴定及细胞计数,扫描电子显微镜形态鉴定和18S rDNA克隆文库限制性片段长度多态性(RFLP)分析3种方法在研究低等白蚁肠道鞭毛虫群落结构中的优缺点,以及建立基于分子标记快速筛选鞭毛虫种类多样性的方法,本研究通过上述3种方法调查了台湾乳白蚁肠道鞭毛虫的群落结构,并对所得结果进行了比较;利用18S rDNA基因作为分子标记,构建了鞭毛虫18S rDNA克隆文库,对克隆进行RFLP分型和序列分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

白蚁取自上海郊区,通过兵蚁形态鉴定和线粒体细胞色素氧化酶亚基II基因序列比对确定该白蚁为台湾乳白蚁。白蚁在温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度

65% ± 1% 条件下进行避光饲养, 以松木块搭建巢穴并作为食料。仅选取工蚁品级进行后续实验。

## 1.2 化学试剂

Solution U (2.164 g NaCl, 0.773 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.509 g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.784 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.083 g CaCl<sub>2</sub>, 0.048 g MgSO<sub>4</sub> 溶解于 1 L 灭菌水, 过滤除菌) (Cleveland, 1924); Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA 分子量标准物、pMD18-T 载体、限制性内切酶 *Hae* III 均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 由本实验室保存; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

## 1.3 鞭毛虫显微镜观察及计数

将台湾乳白蚁工蚁用 75% 乙醇和灭菌水分别漂洗 1 min 除去体表微生物, 用灭菌刀片将白蚁斩首, 用尖头镊子将整个肠道从腹部最后一个体节处取出。用解剖针刺破后肠膨大部分肠壁, 立即浸没在含有 100 μL Solution U 的 1.5 mL 离心管中, 置于冰上。细胞计数在显微镜下统计血细胞计数板 (XB-K-25, 上海求精生化试剂仪器有限公司) 3 mm × 3 mm × 0.1 mm 体积内各种鞭毛虫数量, 再按照肠道内容物总体积计算鞭毛虫总数。一共对 30 头工蚁肠道鞭毛虫分别进行了显微镜观察和细胞计数。

## 1.4 鞭毛虫扫描电镜观察

台湾乳白蚁肠道内容物提取步骤同 1.3, 内容物浸没在含终浓度 2.5% (v/v) 戊二醛的 Solution U 中固定过夜。1% OsO<sub>4</sub> 固定 1 h 后用浓度分别为 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 和 100% (v/v) 的乙醇进行梯度脱水。样品经 CO<sub>2</sub> 超临界干燥、喷金后, 在 JSM-6360LV 型扫描电子显微镜下进行观察。

## 1.5 肠道总 DNA 的提取

台湾乳白蚁肠道提取步骤同 1.3, 将 100 头兵蚁肠道浸没在含有 500 μL PBS 的玻璃匀浆器中, 充分匀浆后将匀浆液转移至 1.5 mL 离心管中, 匀浆器用 200 μL PBS 冲洗, 冲洗液合并到离心管中。用酚-氯仿法提取肠道总 DNA。提取的总 DNA 用分光光度计进行浓度和质量检测。

## 1.6 18S rDNA 文库构建

以 1.5 制备的 DNA 为模板进行 PCR 反应。扩增用的引物对为 Euk19: 5'-AYYTGGTTGAT YCTGCC-3'; Euk1772: 5'-CBGCAGGTTACCTAC-3'。简并碱基 B 代表碱基 G, T 或 C, 简并碱基 Y 代表碱基 C 或 T。PCR 扩增体系为: 50 μL 反应体系中 ddH<sub>2</sub>O 37.7 μL; Ex Taq Buffer 5.0 μL; dNTP

Mixture 4.0 μL; DNA (10 ng/μL) 1 μL; Euk19 1.0 μL; Euk1772 1.0 μL; Ex Taq 0.3 μL。PCR 扩增条件为: 94℃ 变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 割取长度约 1 700 bp 的条带进行胶回收, 回收产物与 pMD18-T 载体 16℃ 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞后涂布于含 IPTG 和 X-Gal 的氨苄平板上培养 16 h, 挑取白色单克隆共两块 96 孔板进行后续实验。

## 1.7 酶切分型

以挑取的单克隆为模板扩增 18S rDNA 插入片段, 扩增条件同 1.6。用具有四碱基识别位点 (GGCC) 的限制性内切酶 *Hae* III 酶切 PCR 扩增产物, 以产生具有长度多态性的酶切片段。酶切反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 2.9 μL; PCR 产物 6.0 μL; buffer M 1.0 μL; *Hae* III 0.1 μL。一共 10 μL 反应体系, 于 37℃ 水浴 2 h, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切条带多样性。

## 1.8 序列分析

挑相同 RFLP 带型各 3 个克隆进行测序, 测序结果去除载体和引物序列后在 NCBI 进行 Blastn 同源序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。采用 MEGA 5.03 进行 18S rDNA 聚类分析, 构建 NJ 进化树, 每节点设 500 次自举检测。

## 1.9 数据统计与分析

确定某一 RFLP 带型属于哪种鞭毛虫后, 以每种带型所代表的克隆数计算鞭毛虫的相对数量。将细胞计数和 18S rDNA 分析获得的各鞭毛虫数以及伪披发虫头数为基数进行均一化处理, 比较两种方法所反映的鞭毛虫相对数量。用 Prism 4 进行数据统计分析, 计算细胞计数获得各鞭毛虫数量的平均值和标准偏差以及 18S rDNA 分析获得的各鞭毛虫数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于光学显微镜和扫描电镜方法的鞭毛虫形态鉴定

在光学显微镜下能清楚地区分台湾乳白蚁肠道内 3 种鞭毛虫 (图 1)。伪披发虫是台湾乳白蚁肠道内细胞体积最大的鞭毛虫, 呈纺锤形, 长度大约在 150 ~ 250 μm 之间, 前端具有明显的喙状结构, 细胞周围分布有鞭毛, 与 Noda 等 (2005) 结果相同; 全鞭毛虫 *Holomastigotoides mirabile* 是细胞体积居中



的鞭毛虫, 呈卵形长度大约在  $50 \sim 150 \mu\text{m}$  之间, 细胞周围分布有鞭毛; 旋披发虫 *Spirotrichonympha leidyi* 是细胞体积最小的鞭毛虫, 呈两端大小差异明显的锥形, 长度大约在  $20 \sim 50 \mu\text{m}$  之间, 鞭毛缠

绕在细胞表面形成螺旋状鞭毛带, 细胞周围分布有鞭毛, 与 Yoshimura (1995) 结果相同。在扫描电子显微镜下, 由于鞭毛虫体表鞭毛的遮挡, 只能从细胞大小和形态上区分 3 种鞭毛虫。

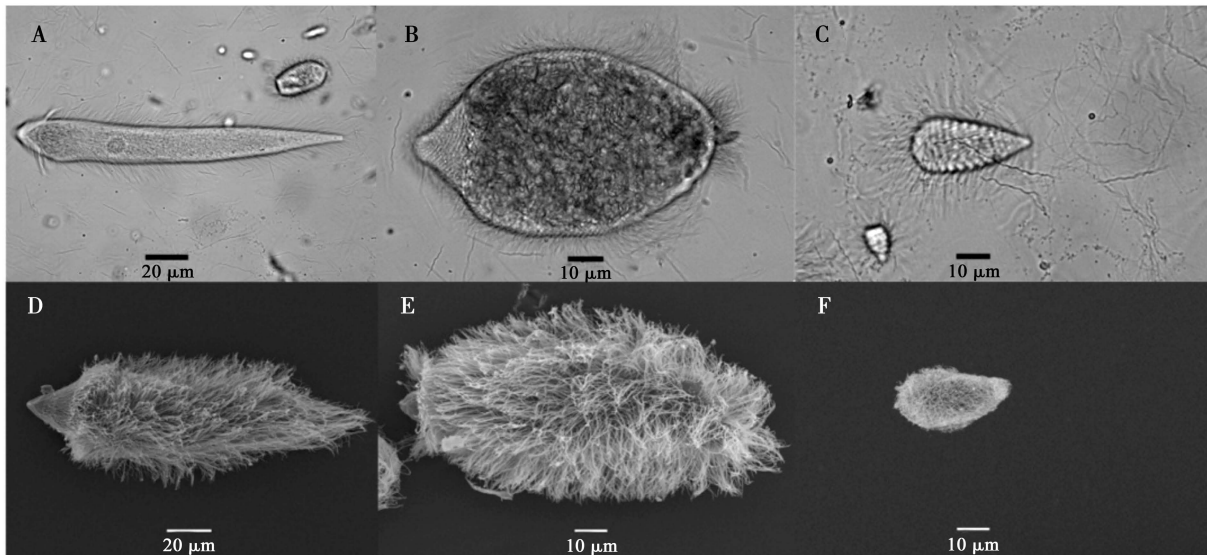


图 1 台湾乳白蚁肠道鞭毛虫形态鉴定

Fig. 1 Morphological identification of flagellates in the gut of *Coptotermes formosanus*

A, B, C: 普通光学显微镜观察 Optical microscopic observation; D, E, F: 扫描电子显微镜观察 Scanning electron microscopic observation. A, D: 伪披发虫 *Pseudotriconympha grassii*; B, E: 全鞭毛虫 *Holomastigotoides mirabile*; C, F: 旋披发虫 *Spirotrichonympha leidyi*.

## 2.2 肠道鞭毛虫数量

对 30 头台湾乳白蚁工蚁肠道鞭毛虫数量进行了统计, 伪披发虫的数量为  $780 \pm 179$  头, 全鞭毛虫  $1\ 630 \pm 391$  头, 旋披发虫  $2\ 950 \pm 1\ 003$  头。细胞体积最大的伪披发虫数量相对较少, 而细胞体积最小的旋披发虫数量较大。以数量最少的伪披发虫头数为基数, 各鞭毛虫头数的比值为伪披发虫:全鞭毛虫:旋披发虫 = 1.0:2.1:3.8 (图 3)。每头台湾乳白蚁肠道内鞭毛虫总数为  $5\ 360 \pm 1\ 447$  头。

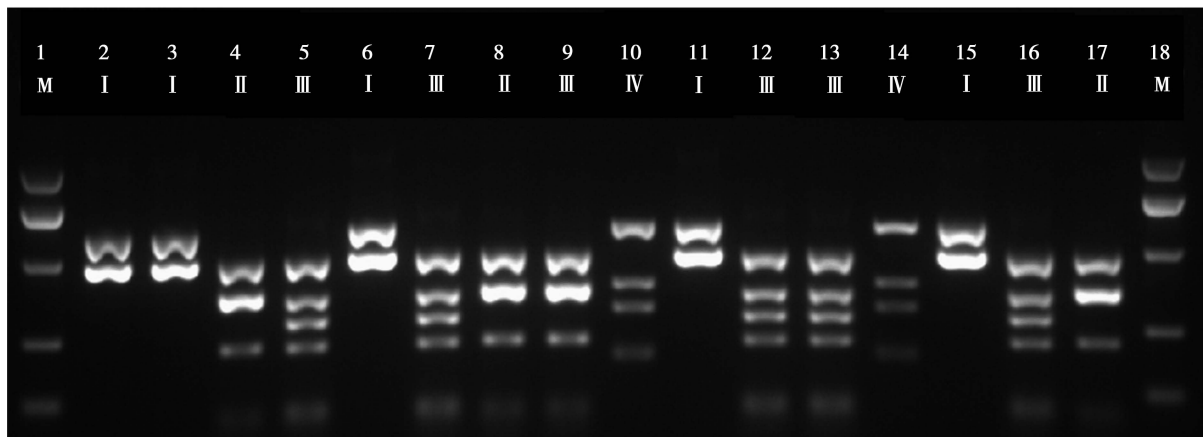
## 2.3 18S rDNA RFLP 分型

以 96 孔板中每个孔内菌液作为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 *Hae* III 酶切 2 h 后进行琼脂糖凝胶电泳检测。酶切后可清楚的辨认产生 4 种带型, 结果如图 2 所示。带型 I 由一条约 600 bp 的条带和一条约 500 bp 的条带组成; 带型 II 由一条约 500 bp 的条带、一条约 350 bp 的条带和一条约 200 bp 的条带组成; 带型 III 由一条约 500 bp 的条带、一条约 350 bp 的条带、一条约 280 bp 的条带和一条约 200 bp 的条带组成; 带型 IV 由一条约 600 bp 的条带、一条约 370 bp 的条带、一条约 300 bp 的条带和一条约 200 bp 的条带组成。通过对两块 96 孔板共 181 个有效克隆的 RFLP 带型统计, 带型 I 克隆数

45 个; 带型 II 克隆数 27 个; 带型 III 克隆数 59 个; 带型 IV 克隆数 50 个。

## 2.4 18S rDNA 序列比对分析

为了获得每一种带型所对应的 18S rDNA 序列, 我们对每种带型随机挑取了 3 个克隆进行测序。测序结果去掉引物序列后提交到 GenBank (表 1)。所得序列在 NCBI 进行 blastn 比对, 结果如表 1 所示。带型 I 对应的 18S rDNA 序列与已知的来自伪披发虫的序列相似性为 100.0%; 带型 II 对应的序列与已知的来自全鞭毛虫的序列相似性为 94.8%; 带型 III 对应的序列与已知的来自全鞭毛虫的序列相似性为 99.2%; 带型 IV 对应的序列与已知的来自旋披发虫的序列相似性为 99.2%。在 4 种 RFLP 带型中, 带型 I, III 和 IV 与已报道的序列相似性较高, 均在 99.0% 以上, 带型 II 与已报道的序列相似性较低仅为 94.8%。在 18S rDNA 文库的 181 个有效克隆中含有伪披发虫 18S rDNA 克隆数 45 个, 全鞭毛虫克隆数 86, 旋披发虫克隆数 50 个。以数量最少的伪披发虫 18S rDNA 克隆数为基数, 各鞭毛虫的克隆数比值为伪披发虫:全鞭毛虫:旋披发虫 = 1.0:1.9:1.1 (图 3)。

图2 18S rDNA 文库克隆 *Hae* III 酶切分型结果Fig. 2 RFLP patterns of *Hae* III digested 18S rDNA clones

M: DNA 分子量标准物 DL2000 DNA molecular marker DL2000; 2 - 17: 随机挑取克隆 PCR 产物经限制性内切酶消化后电泳条带 Electrophoresis pattern of PCR products digested by restriction enzyme. I, II, III, IV: RFLP 带型 RFLP patterns.

表1 18S rDNA 文库 RFLP 带型对应克隆序列比对结果

Table 1 Blastn search results of clones with different RFLP patterns

克隆编号 Clone code	序列来源 Organism source of the sequence	RFLP 带型 RFLP pattern	相似性(%) Similarity	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Cf a6	伪披发虫 <i>Pseudotriconympha grassii</i>	I	100.0	AB262486
Cf g8	全鞭毛虫 <i>Holomastigotoides mirabile</i>	II	94.8	JN585011
Cf a12	全鞭毛虫 <i>Holomastigotoides mirabile</i>	III	99.2	JN585010
Cf e7	旋披发虫 <i>Spirotriconympha leidy</i>	IV	99.9	JN585012

## 2.5 细胞计数和 18S rDNA 文库获得鞭毛虫比例的比较

将细胞计数和 18S rDNA 分析获得的各鞭毛虫数以伪披发虫头数为基数进行均一化处理, 比较两种方法所反映的鞭毛虫相对数量(图 3)。结果显示 18S rDNA 文库中每种 18S rDNA 的克隆数能在一定程度上反映鞭毛虫群落结构。如图 3 所示, 对于细胞较大的伪披发虫和全鞭毛虫, 细胞计数和 18S rDNA 文库获得的比例基本一致。

## 2.6 台湾乳白蚁肠道鞭毛虫系统进化分析

根据 NCBI 报道的来自其他鞭毛虫的 18S rDNA 序列构建了系统发育树, 从图 4 上可以看出本研究获得的 4 条 18S rDNA 序列聚成 3 簇。其中 Cf a12 和 Cf g8 与全鞭毛虫聚成一簇属于 *Holomastigotoididae*; Cf e7 与旋披发虫聚成一簇属于 *Trichonymphidae*; Cf a6 与伪披发虫聚成一簇属于 *Teranympidae*。

## 3 讨论

通过形态特征鉴定了台湾乳白蚁肠道中的 3 种

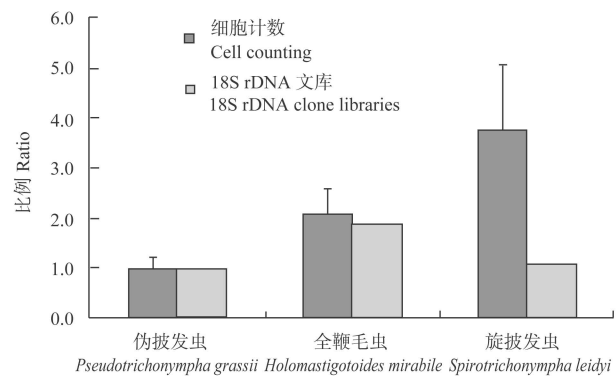


图3 细胞计数和 18S rDNA 文库获得 3 种鞭毛虫比例的比较

Fig. 3 Comparison of the ratios of each flagellate derived from cell counting and 18S rDNA clone libraries

18S rDNA 文库中获得的带型 II 和带型 III 均认为是形态鉴定中确认的全鞭毛虫; 3 种鞭毛虫的数量都以伪披发虫的数量为基准进行均一化处理。Both type II and III obtained from 18S rDNA libraries belong to *Holomastigotoides mirabile*. The numbers of three flagellates are normalized according to the number of *Pseudotriconympha grassii*.

鞭毛虫, 与已报道来自日本的台湾乳白蚁肠道鞭毛虫种类一致 (Yoshimura, 1995)。乳白蚁属内不同种白蚁肠道内鞭毛虫不随地理位置的变化而改变,

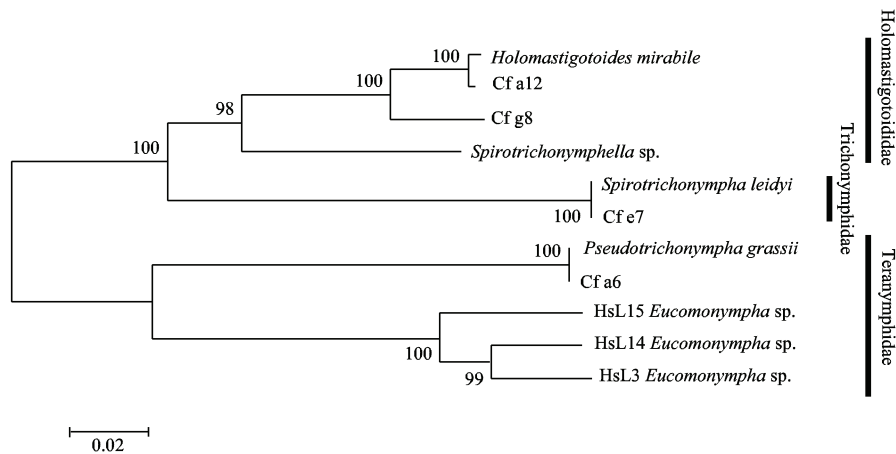


图 4 根据 18S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed from 18S rDNA sequences

用 MEGA 绘制 Neighbor Joining 进化树, 节点处的数字为 500 次自举检测得到的置信度。粗体代码表示在本研究中获得序列; 其他序列均来自 NCBI。Phylogenetic tree is built using Neighbor-Joining method in MEGA followed by 500 replicates bootstrap resampling. Numbers above the branches denote the bootstrap support value. Codes in bold represent sequences obtained in this study, while others are retrieved from NCBI. *Holomastigotoides mirabile* (AB032212); *Spirotrichonymphella* sp. (AB183881); *Spirotrichonympha leidy* (AB032213); *Pseudotriconympha grassii* (AB262486); HsL15 *Eucomonympha* sp. (AB032235); HsL14 *Eucomonympha* sp. (AB032232); HsL3 *Eucomonympha* sp. (AB032231).

支持这些鞭毛虫与白蚁宿主的平行演化学说(李珺等, 1999)。用光学显微镜对鞭毛虫进行形态鉴定时能够比用扫描电子显微镜观察到更多的形态特征。在光学显微镜下由于光线能够穿透鞭毛虫细胞所以能够进行较好的形态鉴定。对样品进行扫描电子显微镜观察时, 由于细胞表面鞭毛的遮挡一些形态特征观察不到(如喙、鞭毛带), 只能从细胞的外形和大小进行辨别, 容易造成误差。

运用 18S rDNA 结合 RFLP 进行鞭毛虫群落研究结果与形态鉴定的结果一致, 但更能反映肠道鞭毛虫的多样性。通过 RFLP 在构建的鞭毛虫 18S rDNA 文库中获得了 4 种带型, 经序列比对发现有 3 种与已报道的序列同源性在 99% 以上, 但带型 II 所代表的 18S rDNA 序列与已知的来自全鞭毛虫的序列相似性不到 95%。在构建的系统发育树中可见带型 II 所代表的克隆 Cf g8 虽然与全鞭毛虫聚为一类但是分支较早, 是一种不同的系统发育型。Harper 等(2009)研究了来源于不同白蚁的鞭毛虫, 通过比较来源于 *Coronympha* 属的 4 种鞭毛虫 18S rDNA 序列发现这些具有生殖隔离的不同种鞭毛虫 18S rDNA 相似性均超过 96%, 而且从形态上很难区分这 4 种鞭毛虫。克隆 Cf g8 所代表的鞭毛虫是否是全鞭毛虫属的一个新种, 它与已报道的全鞭毛虫是否存在生殖隔离, 这些还需要进一步的研究。

对于细胞较大的伪披发虫和全鞭毛虫, 细胞计数和 18S rDNA 文库获得的比例基本一致, 但对于

细胞较小但数量最多的旋披发虫, 18S rDNA 文库获得的克隆比例要少于细胞计数的比例。这可能是因为伪披发虫和全鞭毛虫这些细胞较大的鞭毛虫中存在额外的细胞核或多倍体基因组(Lingle and Salisbury, 1995), 造成进行 PCR 扩增时模板量的增加, 最终导致文库中克隆数的增加。

综上所述, 光学显微镜形态鉴定及细胞计数能够较直观地研究肠道鞭毛虫的种类和数量, 但由于形态特征的限制不能区分形态上相似的鞭毛虫种类。扫描电子显微镜形态鉴定受样品处理方法的制约, 只能从细胞大小和形状上对鞭毛虫进行鉴定, 在研究较复杂的群落时可能产生较大的误差, 而且不能对各种鞭毛虫的数量进行统计。18S rDNA 克隆文库 RFLP 分型分析能够不受细胞形态特征的限制研究群落结构, 能够通过分子标记的序列分析反映物种多样性和物种丰度。虽然在多样性上 18S rDNA 分子标记较形态鉴定能反映更高的多样性, 但由于物种间 DNA 量的差异 18S rDNA 分子标记在物种丰度研究上存在较大误差。结合光学显微镜形态鉴定和 18S rDNA 克隆文库 RFLP 分型分析两种方法能够比较准确地反映白蚁肠道鞭毛虫群落结构。

## 参考文献 (References)

Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse SM, 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel

- sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS ONE*, 4(7): e6372.
- Chen H, Mei JF, Min H, 2005. Microorganisms in termite gut. *J. Microbiol.*, 25(2): 75–79. [陈虹, 梅建凤, 闵航, 2005. 白蚁肠道微生物. *微生物学杂志*, 25(2): 75–79]
- Cleveland LR, 1923. Correlation between the food and morphology of termites and the presence of intestinal protozoa. *Am. J. Hyg.*, 3(4): 444–461.
- Cleveland LR, 1924. The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar. *Biol. Bull.*, 46: 178–227.
- Gerbod D, Sanders E, Moriya S, Noel C, Takasu H, Fast NM, Delgado-Viscogliosi P, Ohkuma M, Kudo T, Capron M, Palmer JD, Keeling PJ, Viscogliosi E, 2004. Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31(2): 572–580.
- Harper JT, Gile GH, James ER, Carpenter KJ, Keeling PJ, 2009. The inadequacy of morphology for species and genus delineation in microbial eukaryotes: an example from the parabasalian termite symbiont *Coronympha*. *PLoS ONE*, 4(8): e6577.
- Husseneder C, 2010. Symbiosis in subterranean termites: a review of insights from molecular studies. *Environ. Entomol.*, 39(2): 378–388.
- Keeling PJ, Poulsen N, McFadden GI, 1998. Phylogenetic diversity of parabasalian symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45(6): 643–650.
- Lai PY, Tamashiro M, Fujii JK, 1983. Abundance and distribution of the three species of symbiotic protozoa in the hindgut of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Proc. Haw. Entomol. Soc.*, 24: 271–276.
- Li J, Zhang ZZ, Li TS, 1999. Distribution of intestinal protozoa among lower termites and its evolutionary implication. *Sci. Technol. Termites*, 16(2): 1–7. [李珺, 张贞华, 李桃生, 1999. 低等白蚁肠道内原生动物的分布及其进化化学意义. *白蚁科技*, 16(2): 1–7]
- Lingle WL, Salisbury JL, 1995. Ultrastructure of the parabasalid protist *Holomastigotoides*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42(5): 490–505.
- Medlin LK, Kooistra WHCF, 2010. Methods to estimate the diversity in the marine photosynthetic protist community with illustrations from case studies: a review. *Diversity*, 2(7): 973–1014.
- Nakajima H, Hongoh Y, Usami R, Kudo T, Ohkuma M, 2005. Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54(2): 247–255.
- Noda S, Iida T, Kitade O, Nakajima H, Kudo T, Ohkuma M, 2005. Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8811–8817.
- Noda S, Kitade O, Inoue T, Kawai M, Kanuka M, Hiroshima K, Hongoh Y, Constantino R, Uys V, Zhong J, Kudo T, Ohkuma M, 2007. Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha* spp.), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol. Ecol.*, 16(6): 1257–1266.
- Ohkuma M, Ohtoko K, Grunau C, Moriya S, Kudo T, 1998. Phylogenetic identification of the symbiotic hypermastigote *Trichonympha agilis* in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus* based on small-subunit rRNA sequence. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45(4): 439–444.
- Ohkuma M, Ohtoko K, Iida T, Tokura M, Moriya S, Usami R, Horikoshi K, Kudo T, 2000. Phylogenetic identification of hypermastigotes, *Pseudotrichonympha*, *Spirotrichonympha*, *Holomastigotoides*, and parabasalian symbionts in the hindgut of termites. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47(3): 249–259.
- Ohkuma M, Saita K, Inoue T, Kudo T, 2007. Comparison of four protein phylogeny of parabasalian symbionts in termite guts. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42(3): 847–853.
- Stoeck T, Behnke A, Christen R, Amaral-Zettler L, Rodriguez-Mora MJ, Chistoserdov A, Orsi W, Edgcomb VP, 2009. Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC Biol.*, 7: 72.
- Tanaka H, Aoyagi H, Shiina S, Dodo Y, Yoshimura T, Nakamura R, Uchiyama H, 2006. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71(6): 907–917.
- Yamin MA, 1979. Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foà reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Sociobiol.*, 4: 1–120.
- Yang H, Peng JX, Liu KY, Hong HZ, 2006. Diversity and function of symbiotic microbes in the gut of lower termites. *Acta Microbiol. Sin.*, 46(3): 496–499. [杨红, 彭建新, 刘凯于, 洪海珠, 2006. 低等白蚁肠道共生微生物的多样性及其功能. *微生物学报*, 46(3): 496–499]
- Yang TC, Mo JC, Cheng JA, 2006. Advances in the study on the digestive mechanism of cellulose in termites. *Sci. Silv. Sin.*, 42(1): 110–115. [杨天赐, 莫建初, 程家安, 2006. 白蚁消化纤维素机理研究进展. *林业科学*, 42(1): 110–115]
- Yoshimura T, 1995. Contribution of the protozoan fauna to nutritional physiology of the lower termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Wood Res.*, 82: 68–129.
- Zeng WH, Liu RX, Zhong JH, 2010. The termite intestinal symbiont cellulolytic system. *J. Environ. Entomol.*, 32(3): 392–398. [曾文慧, 刘瑞娟, 钟俊鸿, 2010. 白蚁肠道共生体的纤维素代谢体系. *环境昆虫学报*, 32(3): 392–398]

(责任编辑: 袁德成)