

研究报告



培菌白蚁菌圃和粪便微生物多样性分析

张硕[△] 林子佳[△] 肖元玺 李净净 李枝 倪金凤^{*}

山东大学微生物技术研究院 微生物技术国家重点实验室 山东 青岛 266237

摘要:【背景】培菌白蚁是属于白蚁科的一类与鸡枞菌属真菌共生的高等白蚁，其与体内肠道微生物和体外菌圃微生物形成三维共生体系。【目的】分析培菌白蚁菌圃和粪便的微生物多样性，并与肠道微生物进行比较。【方法】通过 Illumina MiSeq 高通量测序方法对培菌白蚁菌圃和粪便样品进行细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 测序分析。【结果】高通量测序获得培菌白蚁菌圃和粪便样品细菌和真菌的有效序列和 OTU 数目。5 个样品细菌 OTU 数目在 90–199 之间，而真菌 OTU 在 10–58 之间，细菌的种类多样性明显大于真菌。不论是细菌还是真菌，粪便样品的 OTU 数目多于菌圃样品。经物种分类分析，菌圃样品主要优势细菌是变形菌门(*Proteobacteria*)，其相对含量超过 82.4%；其次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)；粪便样品中优势细菌为拟杆菌门，其次是变形菌门，粪便优势菌属为别样杆菌属和营发酵单胞菌属，这与培菌白蚁肠道菌多样性组成一致。培菌白蚁菌圃和粪便样品共生真菌主要为担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*)。菌圃优势真菌为鸡枞菌属(*Termitomyces*)，相对含量在 51.83%以上，菌圃中还鉴定到炭角菌属(1%，*Xylaria*)。【结论】为今后培菌白蚁-体内外微生物共生关系研究以及微生物的分离培养提供了依据和参考。

关键词：培菌白蚁，菌圃，粪便，细菌和真菌多样性

Symbiotic microorganism diversity in comb and feces of fungus-growing termite

ZHANG Shuo[△] LIN Zi-Jia[△] XIAO Yuan-Xi LI Jing-Jing LI Zhi NI Jin-Feng^{*}

State Key Laboratory of Microbial Technology, Institute of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, Shandong 266237, China

Abstract: [Background] Fungus-growing termites are a kind of higher termites belonging to the family *Macrotermitinae* that cultivated monofungus (*Termitomyces* spp.) in their nest. Fungus-growing termites form a three-dimensional symbiosis system with intestinal microbes and microorganisms in the fungus garden. [Objective] To analyze the microbial diversity of fungus combs and termite feces, and compares with intestinal microbes of fungus-growing termites. [Methods] The bacterial 16S rRNA gene amplicon

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31970119, 31272370)

△These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-532-58631564; E-mail: jinfgni@sdu.edu.cn

Received: 30-07-2020; Accepted: 23-09-2020; Published online: 23-09-2020

基金项目：国家自然科学基金(31970119, 31272370)

△对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 0532-58631564; E-mail: jinfgni@sdu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-30; 接受日期: 2020-09-23; 网络首发日期: 2020-09-23

and fungal ITS rRNA analysis were performed by the Illumina MiSeq high-throughput sequencing method. **[Results]** The number of filtered sequences and OTU numbers of bacteria and fungi in samples of fungus comb and feces were obtained. The number of bacterial OTU in the five samples was between 90–199, while the fungal OTU was between 10–58. The diversity of bacteria was significantly greater than that of fungi. Both the number of OTU in bacteria and fungi in fecal samples are more than that in fungus comb samples. According to the analysis of taxa classification, the dominant phylum in the fungus comb samples are *Proteobacteria*, with a relative content of over 82.4%; followed by *Bacteroidetes* and *Firmicutes*; the dominant bacteria in fecal samples are *Bacteroides*, followed by *Proteobacteria*. The dominant bacteria belong to *Alistipes* and *Dysgonomonas*, which is consistent with the diversity of intestinal bacteria in fungus-growing termites. The dominant fungi in termite comb and fecal samples are mainly *Basidiomycota* and *Ascomycota*. The dominant fungi genus in fungus comb is *Termitomyces*, with a relative content of more than 51.83%. *Xylaria* is also identified in the comb. **[Conclusion]** This study provides a basis and reference for the future research on the symbiosis of fungus-growing termites with *in vivo* and *in vitro* microorganisms and the isolation and culture of microorganisms.

Keywords: Fungus-growing termites, Fungus comb, Feces, Bacterial and fungal diversity

白蚁属于昆虫纲的蜚蠊目,是主要的社会性昆虫之一^[1]。白蚁广泛分布于热带和亚热带地区,几乎遍布地球陆地表面积的一半以上,在全球物质循环尤其是碳循环代谢中发挥重要作用^[2-3]。白蚁肠道有多种共生微生物,包括细菌、古菌、真菌和原生动植物如鞭毛虫,通常根据后肠是否有鞭毛虫将白蚁分为低等白蚁和高等白蚁两大类^[4-5]。目前总共有 3 000 多种白蚁,在分类学上将其分为 7 个科,其中低等白蚁含有 6 个科,分别为原白蚁科(*Termopsidae*)、草白蚁科(*Hodotermitidae*)、木白蚁科(*Kalotermitidae*)、澳白蚁科(*Mastotermitidae*)、鼻白蚁科(*Rhinotermitidae*)和齿白蚁科(*Serritermitidae*),合计约占白蚁种类的 25%;高等白蚁只有一个科为白蚁科(*Termitidae*),占白蚁种类的 75%^[2-3]。培菌白蚁(fungus-growing termites)是属于白蚁科(*Termitidae*)大白蚁亚科(*Macrotermitinae*)的一类白蚁,因为与鸡枞菌属(*Termitomyces*)真菌共生而得名^[6-7]。培菌白蚁通过白蚁自身、肠道微生物和外部共生真菌的协同作用,具有更高效地消化降解食物的能力,因而引起研究者的广泛兴趣。培菌白蚁取食木质碎屑,经过肠道的初步消化排出形成菌圃(fungus comb),菌圃上生长小白球真菌。菌圃和生长的真菌都可为白蚁提供丰富的营养物

质^[8]。白蚁取食菌圃和小白球真菌后排出粪便^[9]。关于白蚁肠道微生物多样性已有比较多的研究^[10-14],但是菌圃和白蚁粪便微生物多样性的报道较少^[15-16],尚无粪便微生物多样性的分析。为了了解培菌白蚁菌圃(初级粪便)和最终粪便的微生物种类和丰度,本研究采用高通量测序方法,对黄翅大白蚁菌圃和粪便两个样本的 16S rRNA 基因和 ITS 序列进行分析,以期了解两个样本的细菌和真菌种类组成和多样性,为更深层次地解析培菌白蚁食物消化降解机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白蚁样品

培菌白蚁及其巢于 2018 年 11 月底在广东韶关采集,运输到实验室后,散落的菌圃于 -20 °C 冷冻保存,完整的黄翅大白蚁巢放入塑料盒饲养,之后收集白蚁产生的粪便冷冻保存。本实验 5 个样品分别为黑翅土白蚁菌圃(T1C)、黄翅大白蚁菌圃(T2C: 正常菌圃; T3C: 含炭角菌菌圃)、黄翅大白蚁粪便(T4F 和 T5F)。

1.1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit、DNA 纯化试剂盒, Omega 公司; Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit、

2×*Taq* MasterMix DNA 聚合酶, TaKaRa 公司。Illumina MiSeq 高通量测序由金唯智科技有限公司完成。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, UVP 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取

按照 DNA 提取试剂盒说明书从样本中提取 DNA, 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 检测 DNA 浓度, 利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 质量。

1.2.2 PCR 扩增及文库构建

以上述提取的 DNA 为模板, 用上游引物 (5'-CCTACGGRRBGCASCAGKVRVGAAT-3')和下游引物 (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAATCC-3')进行 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域。用上游引物 (5'-CGWTAACGAACGAG-3')和下游引物 (5'-AICCATCAATCGG-3')扩增真菌 ITS rRNA 的 ITS2 区。另外, 通过 PCR 给 16S rRNA 基因和 ITS 序列的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头, 以便进行 NGS 测序。PCR 反应体系: 2×*Taq* MasterMix 25 μL, 细菌或者真菌上、下游引物 (10 μmol/L) 分别 1 μL, 模板 DNA 20-30 ng, 加无菌水至 50 μL。扩增细菌的 PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 5 s, 57 °C 90 s, 72 °C 10 s, 24 个循环; 72 °C 5 min。扩增真菌的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。通过酶标仪检测文库浓度。将文库定量到 10 nmol/L, 按 Illumina MiSeq 仪器使用说明书进行 PE250/PE300 双端测序, 由 MiSeq 自带的 MiSeq Control Software (MCS) 读取序列信息。

1.2.3 高通量测序数据分析

双端测序得到的正反向 Reads 首先进行两两拼接, 过滤拼接结果中含有 N 的序列, 保留序列长度大于 200 bp 的序列。经过质量过滤去除嵌合体序列, 最终得到的序列按照序列间的距离进行聚类, 以 97% 以上的相似序列作为划分阈值, 使用 VSEARCH (1.9.6) 进行归类分析并生成可操作分

类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。比对的 16S rRNA 基因和 ITS 序列参考数据库是 Silva 132。利用 RDP classifier (ribosomal database program) 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。基于 OTU 得到分析结果, 采用对样本序列进行随机抽取的方法, 分别计算 Shannon、Chao1 等 α 多样性指数及 Rarefaction 曲线反映群落的物种丰度和多样性。

2 结果与分析

2.1 有效序列数和 OTU 聚类分析

测序后经质控、去嵌合体、拼接后获得有效序列。5 个样品的 16S rRNA 基因和 ITS 的有效序列如表 1 所示, 16S rRNA 基因序列条数分布在 59 083-110 271 之间, 其中菌圃样品的有效序列条数高于粪便样品; 而 ITS 有效序列条数在 63 755-93 280 之间。在 97% 的相似水平下, 对样品进行 OTU 聚类分析。5 个样本细菌的 OTU 分别为 90、164、143、199、91 个; 而真菌的 OTU 分别为 29、11、10、58、55 个 (表 1)。细菌 OTU 数明显多于真菌, 表明样品中的细菌种类多样性大于真菌。另外, 不管是细菌还是真菌, 粪便样品的 OTU 数值都大于菌圃样品的 OTU, 说明粪便比菌圃具有更多的微生物多样性。

2.2 稀释性曲线和 α 多样性指数分析

稀释性曲线 (rarefaction curve) 是用于描述随着样本量的加大可能检测到的物种种类随之增加的状况, 是调查样本的物种组成和预测样本中物种丰度的有效工具, 在生物多样性和群落调查中被广泛用于判断样本量是否充分以及估计物种丰富度。因此, 通过稀释曲线不仅可以判断样本量是否充分, 在样本量充分的前提下, 运用稀释曲线还可以对物种多样性和丰富度进行预测。从图 1 可以看出, 5 个样品 16S rRNA 基因测序 (图 1A) 和 ITS rRNA 测序 (图 1B) 的 OTU 稀释曲线都是随着测序量的深度增加而增加, 刚开始曲线指数上升, 然后

表 1 培菌白蚁菌圃和粪便细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域测序分析数据

Table 1 Information of sequencing of 16S rRNA gene and ITS region of comb and feces from fungus-growing termites

高通量测序 High-throughput sequencing	样品 Sample	来源 Origin	有效序列 Number of filtered tags	平均长度 AvgLen (bp)	(G+C)mol%	OTU 聚类数 OTU number
16S rRNA	T1C-16S	Of comb	110 271	459.22	51.89	90
	T2C-16S	Mb comb	101 506	457.22	53.24	164
	T3C-16S	Mb comb	87 034	461.98	54.12	143
	T4F-16S	Mb feces	61 927	455.45	51.17	199
	T5F-16S	Mb feces	59 083	453.54	52.04	191
ITS rRNA	T1C-ITS	Of comb	93 280	335.18	45.72	29
	T2C-ITS	Mb comb	70 957	315.78	47.85	11
	T3C-ITS	Mb comb	63 755	323.90	47.06	10
	T4F-ITS	Mb feces	75 236	301.55	46.44	58
	T5F-ITS	Mb feces	76 748	299.53	48.17	55

注: C: 菌圃; F: 粪便; Of: 黑翅土白蚁; Mb: 黄翅大白蚁。

Note: C: Comb; F: Feces; Of: *Odontotermes formosanus*; Mb: *Macrotermes barneyi*.

逐渐增加变缓, 在序列数目>30 000 条后, 稀释曲线进入平稳期。通常当曲线趋于平缓时表示随着抽取的数据量加大, 检测到的 OTU 数目不再增加, 说明此时的测序数据量较为合理。本实验测序量合理, 应该最大程度地检测到了培菌白蚁菌圃和粪便样品中的细菌和真菌种类。

α 多样性指数分析可衡量和反映样品微生物群落的丰度和多样性, 由表 2 可知, 粪便样品细菌的 Chao1 指数、ACE 指数均大于菌圃的 Chao1 指数和 ACE 指数, 再次表明粪便样品中细菌群落的

丰度大于菌圃样品的丰度; 其次, 16S rRNA 基因 Shannon 指数和 Simpson 指数也呈现一致的现象, 可说明培菌白蚁粪便中细菌的多样性要高于菌圃。

与 16S rRNA 基因分析数据相比较, 真菌 ITS 的多样性指数总体上都小于 16S rRNA 基因分析的多样性指数, 说明 5 个样品中的真菌种类数都少于细菌种类数。单独看真菌 ITS 的多样性指数, 结果基本与细菌类似, 也就是粪便样品真菌的各项指数均大于菌圃样本的相关数值, 粪便样品的真菌种类多样性大于菌圃。一般情况下, Coverage 指数的数

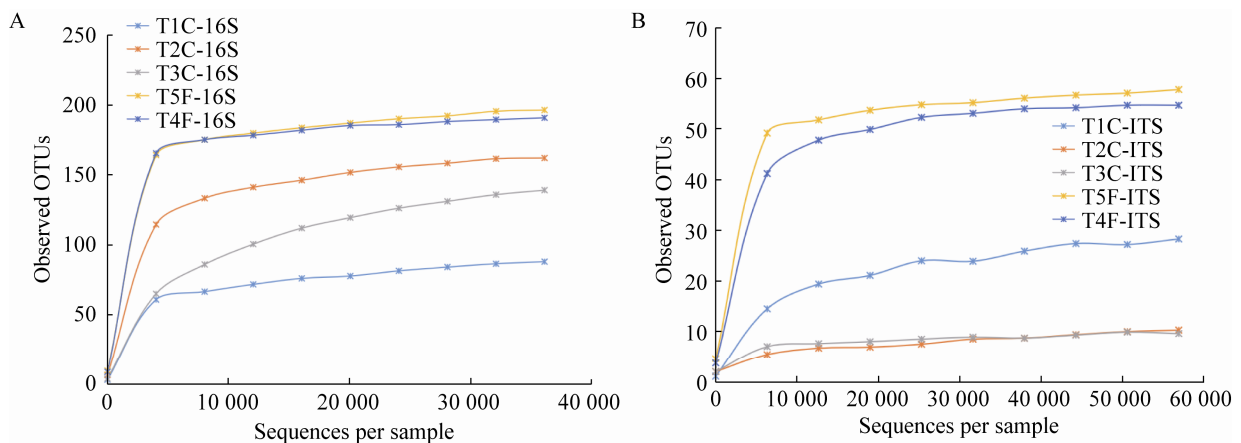


图 1 培菌白蚁菌圃和粪便细菌 16S rRNA 基因(A)和真菌 ITS (B)的稀释曲线分析

Figure 1 Rarefaction curve analysis of 16S rRNA gene (A) and fungal ITS (B) of comb and feces from fungus-growing termites

表 2 培菌白蚁菌圃和粪便样品细菌和真菌的 α 多样性指数分析

Table 2 Analysis of diversity index of bacteria and fungi in comb and feces of fungus-growing termites

高通量测序 High-throughput sequencing	样品 Sample	ACE index	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	Coverage
16S rRNA	T1C-16S	111.282	105.111	1.977	0.416	1
	T2C-16S	171.630	168.875	4.021	0.806	1
	T3C-16S	167.769	172.333	2.272	0.662	0.999
	T4F-16S	216.317	216.000	6.625	0.985	1
	T5F-16S	198.629	207.000	6.125	0.960	1
ITS rRNA	T1C-ITS	34.131	39.500	0.170	0.035	1
	T2C-ITS	22.002	21.000	1.060	0.506	1
	T3C-ITS	NA	13.000	1.033	0.469	1
	T4F-ITS	60.705	60.000	2.660	0.747	1
	T5F-ITS	55.614	55.333	2.140	0.685	1

注: C: 菌圃; F: 粪便; NA: 未获得.

Note: C: Comb; F: Feces; NA: Not available.

值越高, 样本中序列未被测出的概率越低。本测序分析中 Coverage 指数值均大于 0.95, 接近 1 (表 2), 说明样品的序列基本上都被检出, 即测序结果可反映培菌白蚁菌圃和粪便样品微生物种类的真实情况。

2.3 培菌白蚁样品细菌、真菌在不同分类水平上的分析

2.3.1 细菌在门水平上的分析

各样品经高通量测序检测出的细菌门类组成见图 2A。T1C 包括 7 个细菌门, 优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*, 86.94%), 其次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 8.32%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 3.3%)等; T2C 包括 10 个细菌门, 优势菌门为变形菌门(82.4%), 其次是拟杆菌门(12.62%)、纤维杆菌门(*Fibrobacteres*, 1.9%)、厚壁菌门(1.58%)等; T3C 包括 6 个门, 优势菌门为变形杆菌门(93.38%), 其次是厚壁菌门(4.45%)、拟杆菌门(2.06%); 以上 3 个菌圃样品不论是黑翅土白蚁 T1C 还是黄翅大白蚁 T2C 和 T3C, 变形菌门都是绝对优势菌门, 丰度超过 82.4% (表 3)。在两种白蚁之间主要不同的门是螺旋菌门(*Spirochaetes*), 其在黑翅土白蚁 T1C 中的丰度是 25%, 但是在黄翅大白蚁菌圃和粪便样品中都没有。两个粪便样品 T4F 和 T5F 都

包括 7 个门, 第一优势菌门为拟杆菌门(55.12%–73.38%), 第二优势菌为变形菌门(13.38%–33.57%)。在菌圃中的绝对第一优势菌是变形菌门, 在粪便样品中成为第二优势菌门。

2.3.2 细菌在属水平上的分析

图 2B 显示样品中细菌在属水平的结构分析。从中可以看出, 黑翅土白蚁 T1C 菌属结果明显不同于黄翅大白蚁 T2C 和 T3C。假单胞菌属(*Pseudomonas*, 77.09%)在 T1C 样品中占绝对优势, 相对丰度在 1% 以上的还有别样杆菌属(*Alistipes*, 3.08%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 2.02%)、沙雷氏菌属(*Serratia*, 1.5%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 1.4%)、营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*, 1.31%)和拟杆菌属(*Bacteroides*, 1%)。在 T2C 和 T3C 样品中, 丰度最高的菌属为 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, 在 2 个黄翅大白蚁菌圃中丰度分别为 49.77% 和 90.82%, 与 T3C 相比, T2C 注释到更多的属, 相对丰度在 1% 以上的还有 9 个属: 沙雷氏菌属(*Serratia*, 8.85%)、沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*, 6.7%)、别样杆菌属(*Alistipes*, 5.61%)、鲁泰杆菌(*Luteibacter*, 3.77%)、营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*, 1.63%)、新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*, 1.26%)、鞘氨醇单胞菌属

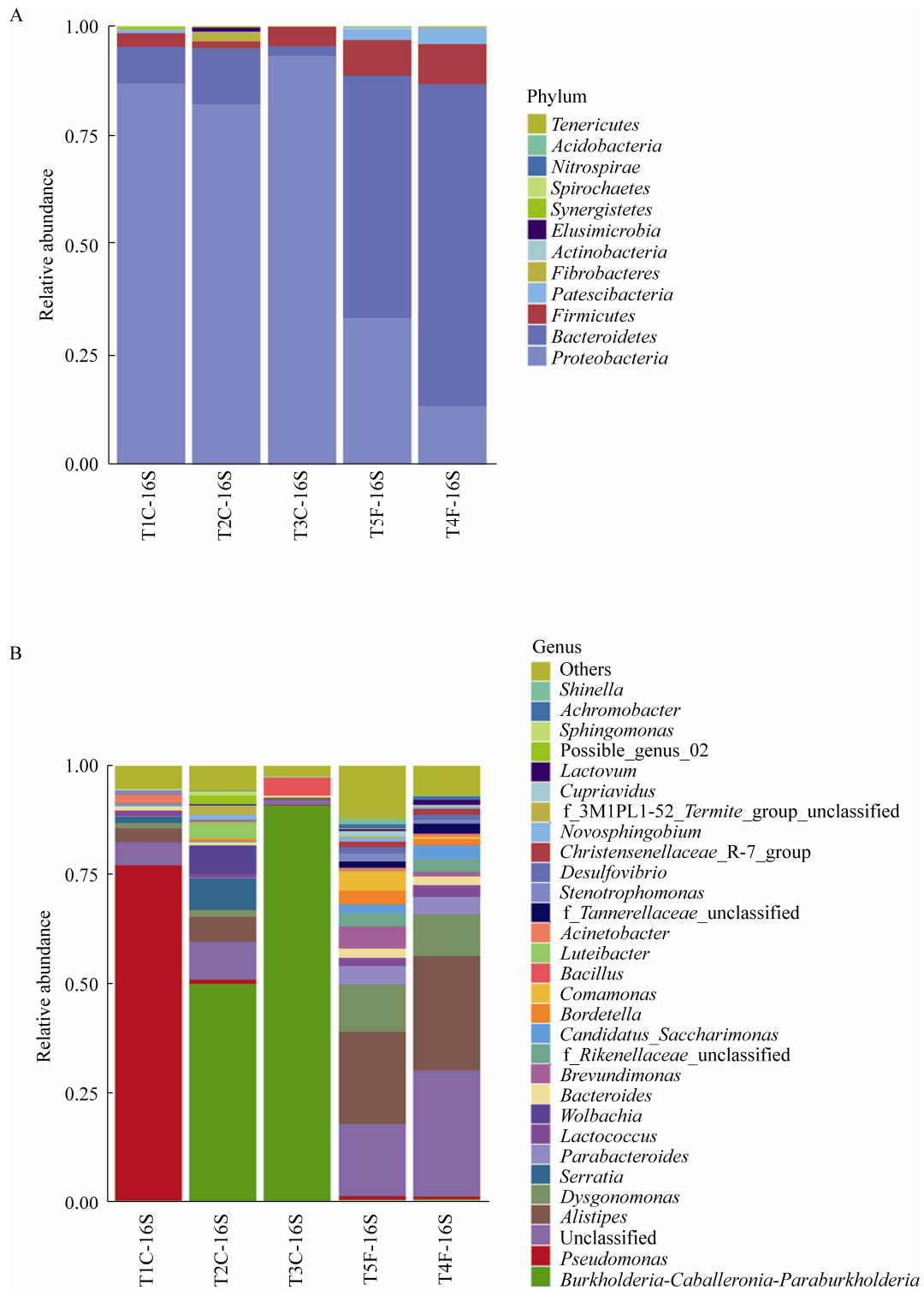


图 2 培菌白蚁样品细菌在门水平(A)和属水平(B)上的柱状分布图

Figure 2 Bacterial community distribution of comb and feces from fungus-growing termites at phylum (A) and genus level (B)

表 3 培菌白蚁样品细菌在门水平的结构分析(相对丰度, %)

Table 3 Structural analysis of bacteria at the phylum level of fungus-growing termites in comb and feces samples (relative abundance, %)

Phylum	T1C-16S	T2C-16S	T3C-16S	T5F-16S	T4F-16S
<i>Proteobacteria</i>	86.94	82.40	93.38	33.57	13.38
<i>Bacteroidetes</i>	8.32	12.62	2.06	55.12	73.53
<i>Firmicutes</i>	3.30	1.58	4.45	8.31	9.13
<i>Patescibacteria</i>	0.60	0.10	0.01	2.36	3.65
<i>Fibrobacteres</i>	0	1.90	0.01	0	0
<i>Actinobacteria</i>	0.18	0.15	0.06	0.58	0.24
<i>Elusimicrobia</i>	0	1.10	0	0.05	0.04
<i>Synergistetes</i>	0.42	0.07	0	0.01	0.02
<i>Spirochaetes</i>	0.25	0	0	0	0
<i>Nitrospirae</i>	0	0.07	0	0	0
<i>Acidobacteria</i>	0	0.01	0	0	0

注: C: 菌圃; F: 粪便.

Note: C: Comb; F: Feces.

(*Sphingomonas*, 1.14%)、迷踪菌属(*Elusimicrobium*, 1.1%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1%); 而 T3C 样品中相对丰度在 1%以上的除了 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (90.82%), 主要是芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4.21%)和盐单胞菌属(*Halomonas*, 1.28%) 2 个菌属。在黄翅大白蚁粪便样品中, T5F 中相对丰度在 1%以上的有 14 个属: 别样杆菌属(*Alistipes*, 21.18%)、营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*, 10.84%)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*, 4.95%)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*, 4.49%)、副杆菌属(*Parabacteroides*, 4.35%)、鲍特杆菌属(*Bordetella*, 3.08%)、拟杆菌属(*Bacteroides*, 2.2%)、*Candidatus_Saccharimonas* (2.04%)、乳球菌属(1.79%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 1.77%)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*, 1.55%)、贪铜菌属(*Cupriavidus*, 1.41%)、*Shinella* (1.34%) 和鞘氨醇菌属(*Sphingopyxis*, 1.18%)。T4F 样品中相对丰度在 1%以上的有 10 个属: 别样杆菌属(26.32%)、营发酵单胞属(9.55%)、副杆菌属(4%)、*Candidatus_Saccharimonas* (3.23%)、乳球菌属(2.7%)、拟杆菌属(1.92%)、鲍特杆菌属(1.44%)、脱硫弧菌属

(1.18%)、短波单胞菌属(1.11%)、*Lactovum* (1.09%)。总而言之, 黑翅土白蚁菌圃(T1C)丰度优势细菌属主要是假单胞菌属和别样杆菌属, 而黄翅大白蚁菌圃(T2C 和 T3C)丰度优势菌属是 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*。在黄翅大白蚁粪便样品中丰度优势菌属为别样杆菌属和营发酵单胞菌属。另外, 与前面 α 多样性指数分析一致, 粪便样品包含更多的细菌菌属(图 2B)。

2.3.3 真菌在门水平上的分析

根据 ITS 序列分析, 注释到真菌门水平的 5 个样品均包含 2 个主要门类: 担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*) (图 3A, 表 4)。在 T1C 黑翅土白蚁菌圃样品中, 担子菌门占绝对优势(98.73%), 含少量的子囊菌门(1.19%); 在黄翅大白蚁 2 个菌圃样品中, 担子菌门和子囊菌门 2 个门类所在比例差异不像黑翅土白蚁样品那么显著, 在 T2C 中担子菌门和子囊菌门分别是 51.83%和 48.17%, 而在 T3C 中 2 个门类分别是 64.19%和 35.81%。在黄翅大白蚁粪便样品中, T4F 优势菌门为担子菌门(79.7%)和子囊菌门(19.69%); 而 T5F 的优势菌门为子囊菌门(53.15%)和担子菌

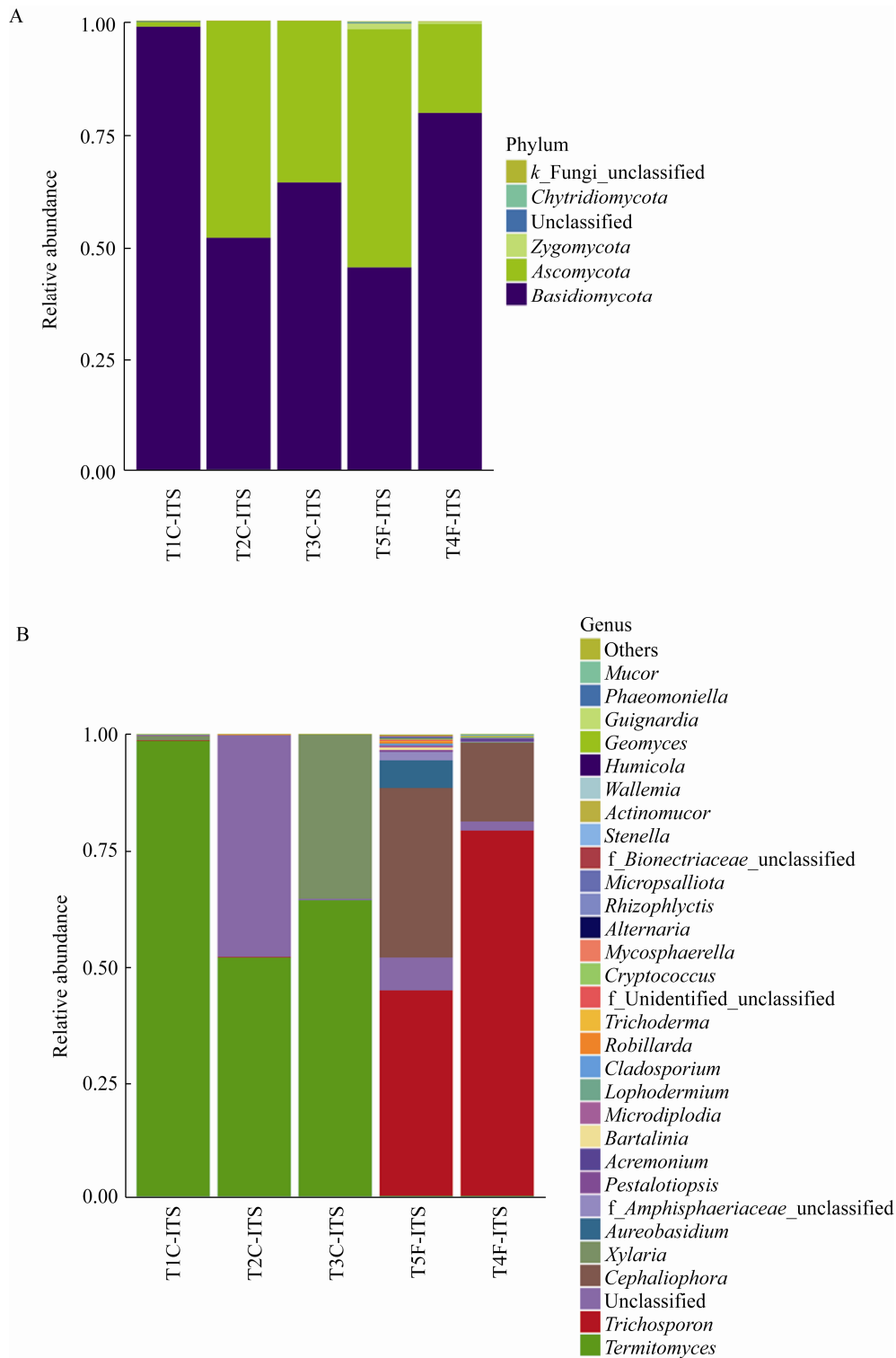


图 3 培菌白蚁样品真菌在门类水平(A)和属水平(B)上的柱状分布图

Figure 3 Fungal community distribution of comb and feces from fungus-growing termites at phylum (A) and genus level (B)

表 4 培菌白蚁样品真菌在门水平的结构分析(相对丰度, %)

Table 4 Structural analysis of fungi at the phylum level of fungus-growing termites in comb and feces samples (relative abundance, %)

Phylum	T1C-ITS	T2C-ITS	T3C-ITS	T5F-ITS	T4F-ITS
<i>Basidiomycota</i>	98.73	51.83	64.19	45.12	79.7
<i>Ascomycota</i>	1.19	48.17	35.81	53.15	19.69
<i>Zygomycota</i>	0.03	0	0	1.37	0.52
Unclassified	0.04	0	0	0.18	0.06
<i>Chytridiomycota</i>	0	0	0	0.18	0.03
Fungi_unclassified	0	0	0	0.01	0.01

门(45.12%) (表 4)。与黄翅大白蚁菌圃样品相比, 粪便样品 T4F 和 T5F 中还注释到 *Zygomycota* 和 *Chytridiomycota* 两个门。

2.3.4 真菌在属水平上的分析

图 3B 展示样品中真菌在属水平的结构分析。菌圃样品中鸡枞菌属(*Termitomyces*)丰度最高。在 3 个菌圃中的丰度分别是: T1C: 98.71%; T2C: 51.83%; T3C: 64.16%。菌圃样品中相对丰度在 1% 以上的属还包括炭角菌属(*Xylaria*), 另外, 在 T2C 菌圃样品中有 48.16% 没有鉴定到属。粪便样品注释到真菌属的数量明显多于菌圃, T5F 包括 27 个属, T4F 包括 23 个属。T5F 样品中相对丰度在 1% 以上的有毛孢子菌属(*Trichosporon*, 44.48%)、*Cephalophora* (36.67%)、短柄霉属(*Aureobasidium*, 6.09%)和 *f_Amphispheariaceae_unclassified* (1.72%), 7.21% 没有鉴定到属。T4F 样品中相对丰度在 1% 以上的有毛孢子菌属(*Trichosporon*, 79.06%)、*Cephalophora* (17.06%), 2.03% 没有鉴定到属。

3 讨论与结论

培菌白蚁是热带和亚热带地区生物质的主要分解者之一, 它们在体外菌圃上专一培养真菌 *Termitomyces*。在培菌白蚁生活史中, 其体内肠道微生物和体外菌圃微生物在培菌白蚁的食物消化利用方面发挥重要作用, 是研究宿主-微生物相互

作用良好的模型系统^[12,17-19]。为了了解肠道菌群的作用, 通过高通量测序、微生物分离培养等方法, 人们对白蚁肠道核心菌群种类多样性等方面开展了许多研究^[10,11,13-14,20-21], 而关于体外菌圃微生物方面的研究比较少^[22]。培菌白蚁菌圃含有细菌和真菌, 本文通过 16S rRNA 基因和 ITS 区域高通量测序分析了菌圃的菌群组成结构, 菌圃是培菌白蚁消化食物后通过肠道排出的初级粪便^[16], 所以我们也分析了培菌白蚁产生的最终粪便的菌群组成。

T1C 是黑翅土白蚁野外采集的菌圃, 其绝对优势菌门是变形菌门, 这一结果与文献报道的下层菌圃(bottom comb)细菌门水平上的组成结构类似^[16]。Liang 等分析了喂食不同食物(leaves 和 branches)黑翅土白蚁菌圃上(top)、中(middle)、下(bottom)细菌组成, 发现上、中菌圃第一主要优势菌门是拟杆菌门, 下层菌圃第一优势菌门是变形菌门。Liang 等研究发现树叶和树枝对黑翅土白蚁菌圃组成比例有一些影响, 但是其核心菌群门比例没有明显变化^[16]。我们野外采集的菌圃属于成熟老菌圃, 所以分析结果和文献中报道的下层菌圃组成一致^[16]。

T2-T5 是黄翅大白蚁的 4 个样品, 前 2 个(T2C 和 T3C)是菌圃, 后 2 个(T4F 和 T5F)是粪便样品。平行样品间虽然组成略有差别, 但是主要优势细菌相同。和黑翅土白蚁一样, 变形菌门是黄翅大白蚁菌圃样品中的第一优势菌, 而在粪便样品中这一地位被拟杆菌门替代, 变形菌门成为第二优势菌。变形菌门可能参与食物的脱毒和消化^[16], 所以在菌圃样品中的比例大于粪便样品。相比菌圃, 粪便样品的细菌组成与培菌白蚁肠道微生物更相似。拟杆菌门是培菌白蚁肠道和粪便样品的第一优势菌, 黄翅大白蚁后肠与粪便优势菌属均为拟杆菌门的别样杆菌属(*Alistipes*)和营发酵单胞菌属(*Dysgonomonas*)^[6,20], 关于这 2 个优势菌属的作用还不清楚^[23]。粪便微生物比菌圃微生物更具多样性且更类似肠道微生物, 可能原因是粪便微生

物大部分来源于肠道。培菌白蚁肠道中的拟杆菌门和厚壁菌门细菌被认为是糖苷水解酶的主要产生菌,培菌白蚁以菌圃上的真菌为食,这些酶可能在白蚁消化真菌细胞壁过程中发挥作用^[13]。

培菌白蚁与鸡枞菌 *Termitomyces* 共生,白蚁从周围环境中收集死亡的植物材料,带到巢中消化,经过白蚁肠道排出的分泌物形成新生菌圃(fresh comb),同时白蚁从环境中获得鸡枞菌孢子。鸡枞菌在菌圃上生长,形成许多小白球菌(fungus nodules),为白蚁提供食物^[22,24]。通过高通量 ITS 区域分析菌圃真菌多样性,丰度最高的真菌是鸡枞菌属(*Termitomyces*)真菌。鸡枞菌不仅提供给培菌白蚁食物,同时也具有抑制其他病原真菌如木霉菌和白僵菌的功能^[22]及拮抗真菌如炭角菌的作用^[25]。另外,培菌白蚁肠道来源放线菌门(*Actinobacteria*)的细菌和厚壁菌门的芽孢杆菌(*Bacillus*)对白蚁环境中的潜在致病菌也有抑制作用^[26-28],在培菌白蚁废弃的巢或者白蚁死亡的巢中,经常看到炭角菌(*Xylaria*)的生长。本研究中的 T2C 和 T3C 都是黄翅大白蚁菌圃,但是 T3C 样品来自白蚁刚刚死亡的巢,所以炭角菌占较高的比例。

综上所述,本研究对培菌白蚁菌圃和粪便样品进行了细菌和真菌种类的高通量测序分析,是首次对白蚁粪便样品进行微生物多样性调查。结果表明白蚁粪便样品与培菌白蚁肠道菌有更多的菌群结构相似性,其细菌和真菌的丰度也明显多于培菌白蚁菌圃。本文加深了人们对培菌白蚁体内外共生微生物的了解和认识,为进一步深入研究培菌白蚁与共生菌群相互作用和关系奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Inward D, Beccaloni G, Eggleton P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches[J]. *Biology Letters*, 2007, 3(3): 331-335
- [2] Eggleton P. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology[A]//Bignell DE, Roisin Y, Lo N. *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer, 2010: 1-26
- [3] Ni JF, Tokuda G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 838-850
- [4] Hongoh Y. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(8): 1311-1325
- [5] Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 168-180
- [6] Sun XX, Wei JH, Li JJ, et al. Whole-genome analysis of the dominant bacterium *Dysgonomonas macrotermidis* in the hindgut of *Macrotermes barneyi*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 995-1003 (in Chinese)
孙新新, 未建华, 李净净, 等. 黄翅大白蚁后肠优势菌大白蚁营发醇菌的全基因组序列分析[J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 995-1003
- [7] Aanen DK, de Fine Licht HH, Debets AJM, et al. High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites[J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1103-1106
- [8] Hinze B, Crailsheim K, Leuthold RH. Polyethism in food processing and social organisation in the nest of *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae)[J]. *Insectes Sociaux*, 2002, 49: 31-37
- [9] da Costa RR, Hu HF, Li HJ, et al. Symbiotic plant biomass decomposition in fungus-growing termites[J]. *Insects*, 2019, 10(4): 87
- [10] Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, et al. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(4): 906-915
- [11] Otani S, Mikaelyan A, Nobre T, et al. Identifying the core microbial community in the gut of fungus-growing termites[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(18): 4631-4644
- [12] Sun XX, Li JJ, Du J, et al. *Cellulomonas macrotermidis* sp. nov., a chitinolytic and cellulolytic bacterium isolated from the hindgut of a fungus-growing termite[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(3): 471-478
- [13] Hu HF, da Costa RR, Pilgaard B, et al. Fungiculture in termites is associated with a mycolytic gut bacterial community[J]. *mSphere*, 2019, 4(3): e00165-19
- [14] Sun XX, Ning N, Tan HJ, et al. Research progress of diversity and function of symbiotic microbes in the gut of termites[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, 23(4): 764-770 (in Chinese)
孙新新, 宁娜, 谭慧军, 等. 白蚁肠道微生物多样性和作用研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(4): 764-770
- [15] Li HJ, Dietrich C, Zhu N, et al. Age polyethism drives community structure of the bacterial gut microbiota in the

- fungus-cultivating termite *Odontotermes formosanus*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(5): 1440-1451
- [16] Liang SY, Wang CP, Ahmad F, et al. Exploring the effect of plant substrates on bacterial community structure in termite fungus-combs[J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0232329
- [17] Poulsen M, Hu HF, Li C, et al. Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus-farming termite[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(40): 14500-14505
- [18] Sun XX, Li JJ, Ning N, et al. Isolation and identification of chitin-degrading bacteria from the hindgut of *Macrotermes barneyi*[J]. Microbiology China, 2017, 44(7): 1649-1654 (in Chinese)
孙新新, 李净净, 宁娜, 等. 黄翅大白蚁后肠几丁质降解微生物的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1649-1654
- [19] Li HJ, Yelle DJ, Li C, et al. Lignocellulose pretreatment in a fungus-cultivating termite[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(18): 4709-4714
- [20] Yang YJ, Zhang N, Ji SQ, et al. *Dysgonomonas macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite[J]. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt_9): 2956-2961
- [21] Otani S, Zhukova M, Koné NA, et al. Gut microbial compositions mirror caste-specific diets in a major lineage of social insects[J]. Environmental Microbiology Reports, 2019, 11(2): 196-205
- [22] Otani S, Challinor VL, Kreuzenbeck NB, et al. Disease-free monoculture farming by fungus-growing termites[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8819
- [23] Mikaelyan A, Dietrich C, Köhler T, et al. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites[J]. Molecular Ecology, 2015, 24(20): 5284-5295
- [24] Vesala R, Harjuntausta A, Hakkarainen A, et al. Termite mound architecture regulates nest temperature and correlates with species identities of symbiotic fungi[J]. PeerJ, 2019, 6: e6237
- [25] Nagam V, Aluru R, Shoaib M, et al. Diversity of fungal isolates from fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* and characterization of bioactive compound from *Xylaria escharoidea*[J]. Insect Science, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12799
- [26] Visser AA, Nobre T, Currie CR, et al. Exploring the potential for actinobacteria as defensive symbionts in fungus-growing termites[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(4): 975-985
- [27] Mathew GM, Ju YM, Lai CY, et al. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(2): 504-517
- [28] Yin CP, Jin LP, Li S, et al. Diversity and antagonistic potential of Actinobacteria from the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*[J]. 3 Biotech, 2019, 9(2): 45