

ARISA 方法研究产甲烷菌共存及去除条件下瘤胃真菌多样性变化

成艳芬, 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室, 南京 210095)

摘要 【目的】建立厌氧真菌多样性分析方法, 并研究厌氧真菌与产甲烷菌共培养液在传代过程中厌氧真菌的区系变化及共培养液中去除产甲烷菌条件下厌氧真菌多样性的变化。【方法】根据厌氧真菌 ITS1 序列长度多态性, 设计厌氧真菌特异性引物, 然后 PCR 扩增样品中厌氧真菌 ITS1 序列, 在基因分析仪中分析 PCR 产物序列长度多态性, 分析共培养液在传代过程中及共培养液中去除产甲烷菌后厌氧真菌多样性的变化。【结果】对瘤胃厌氧真菌 *Caecomyces* 属 YC301 菌株、*Neocallimastix* 属菌株(YC501 与 YC502)的 ARISA 分析结果显示: 菌株 YC301 得到一个长度为 389.67 bp 的片段; YC501 得到 4 个长度分别为 415.91、425.69、437.31 和 438.46 bp 的片段; YC502 所得片段与 YC501 相似。ARISA 分析来自瘤胃内容物的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌多样性显示: 共培养液在体外传代培养过程中, 厌氧真菌多样性降低, ARISA 扩增片段长度为 354~375 及 425~438 bp 的厌氧真菌在体外传代中消失, 片段长度为 383、389~391 及 413~418 bp 的厌氧真菌是体外共培养液中的优势菌, 在传代过程中稳定存在。对厌氧真菌与产甲烷菌共培养液及去除产甲烷菌的真菌培养液研究表明: 产甲烷菌影响培养液中真菌的种类, 当产甲烷菌存在时, 共培养液中主要是片段长度为 383.51、391.44 和 413.55 bp 的厌氧真菌; 而添加氯霉素去除甲烷菌后, 培养液中主要是片段长度为 415.80、425.66、437.46 和 438.47 bp 的厌氧真菌。【结论】本文建立了快速可行的厌氧真菌多样性分析方法。ARISA 分析表明厌氧真菌与产甲烷菌共培养液在传代过程中真菌多样性降低, 共培养液传代 4 次后, 厌氧真菌菌群趋于稳定。去除产甲烷菌后, 共培养液中厌氧真菌的菌群结构发生改变。

关键词: 厌氧真菌; 产甲烷菌; ARISA

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0504-08

厌氧真菌在瘤胃内降解粗纤维产生 H_2 、 CO_2 、甲酸、乙酸等, 瘤胃内产甲烷菌则能利用这些发酵产物生成甲烷。为了研究瘤胃内厌氧真菌与产甲烷菌的代谢关系, 成艳芬等^[1]根据不同瘤胃微生物对抗生素的敏感性差异, 建立了来自瘤胃的厌氧真菌与产甲烷菌共培养系统, 并对其中产甲烷菌多样性进行了研究, 但该研究未对共培养液中的厌氧真菌进行分析。

真核生物核糖体内转录间隔区序列 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 在进化过程中稳定而又有相对变化, 因此被广泛应用于厌氧真菌进化发育关系的研究中。核糖体 18S rRNA 与 5.8S rRNA 之间的内转录间隔区序列为 ITS1 序列, 核糖体 5.8S rRNA 与 28S rRNA 之间的内转录间隔区序列为 ITS2 序列。Li 等利用 ITS1 序列分析研究了厌氧真菌的进化发育关系, 研究表明 *Orpinomyces*、*Neocallimastix*

基金项目: 国家自然科学基金(30530560)

* 通信作者。Tel: +86-25-84395523; Fax: +86-25-84395314; E-mail: zhuweiyunjia@hotmail.com

作者简介: 成艳芬(1980-), 女, 湖北公安人, 博士研究生, 主要从事瘤胃微生物研究。E-mail: yanfencheng@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-27; 修回日期: 2009-01-04

和 *Piromyces* 3 个属与 *Anaeromyces* 和 *Caecomyces* 的进化发育距离较远^[2]。Brookman 等用同样的方法集中研究了 *Neocallimastix* 和 *Piromyces* 2 个属的大量厌氧真菌菌株, 结果显示 2 个属有明显的进化距离^[3]。Tuckwell 等结合应用 ITS1 和 ITS2 序列的 RNA 二级结构, 将厌氧真菌鉴定至属, 但作者同时指出, 该方法在种的界定上的信息量尚不足^[4]。Nicholson 在研究厌氧真菌 ITS1 序列长度多态性时发现, 利用 DGGE 分析厌氧真菌 ITS1 序列, ITS1 序列在 DGGE 胶上的电泳条带相互重合, 分离效果较差, 利用聚丙烯酰胺分离 ITS1 序列的分离效果同样不理想。该作者进一步研究发现, Spreadex 电泳能将差别为 1~2 个碱基的不同片段分开, 在分析厌氧真菌 ITS1 序列时得到了较为理想的长度多态性分析图谱。在其所得的电泳图谱上, 2 株 *Orpinomyces* 菌 ITS1 序列长度分别为 221 和 225 bp, 2 株 *Piromyces* 菌株为 236 和 244 bp, 1 株 *Anaeromyces* 菌为 259 bp, 3 株 *Neocallimastix* 菌分别为 267、277 和 284 bp^[5]。但该作者所报道的引物与约 10% 的厌氧真菌 ITS1 序列 (NCBI) 存在错配现象。

本研究根据厌氧真菌 ITS1 序列特征, 对引物进行了重新设计, 并利用毛细管电泳建立了瘤胃厌氧真菌核糖体内转录间隔区扩增序列长度多态性分析 (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA) 方法, 通过该方法研究了来自瘤胃的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌的多样性, 并进一步研究了去除产甲烷菌对厌氧真菌多样性的影响, 旨在为揭示瘤胃厌氧真菌和瘤胃产甲烷菌间关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 厌氧真菌与产甲烷菌共培养液的富集培养及传代: 瘤胃内容物来自于采食青草的装有永久性瘤胃瘘管的奶牛, 培养基参照朱伟云等^[6]方法配制, 底物为粉碎的稻草 (直径约为 1 mm)。在厌氧条件下称取 10 g 瘤胃内容物, 与 40 mL 厌氧稀释液^[7]混合均匀, 抽取 10 mL 加入已预热至 39℃、含有氨苄青霉素 (2 mg/mL) 的液体培养基中, 39℃ 静置培养。此过程再重复 2 次, 共 3 个重复, 每个重复独立传代, 培养过程中每 3 d 传代一次, 共传代 15 次。青霉素 (1915 IU/mL) 和链霉素 (2031 IU/mL) 与氨苄青霉素交替使用以去除瘤胃内容物中的细菌。

1.1.2 共培养液中产甲烷菌的去除: 厌氧真菌与产

甲烷菌共培养液经过 3 次传代后, 将 10 mL 共培养液接种至含有氯霉素 (50 μg/mL) 的液体培养基中, 去除共培养液中的产甲烷菌, 每 3 天传代一次, 培养基中所用抗生素均为氯霉素, 此培养液即为真菌培养液。

1.1.3 厌氧真菌菌株: 纯厌氧真菌菌株 YC301、YC501 与 YC502 分离自上述共培养液, 形态学鉴定 YC301 为 *Caecomyces* 属, YC501 与 YC502 均为 *Neocallimastix* 属。

1.1.4 培养液中甲烷的测定: 每天收集培养液发酵所产生的气体, 用 GC-MSX Agilent, US 测定气体中甲烷的含量。甲烷产量以体积表示, 数据为平均值 ± 标准差。

1.1.5 主要试剂和仪器: BIO101 FastDNA SPIN DNA 提取试剂盒 (QBiogene, UK); FastPrep 珠磨仪 (QBiogene, UK); *Taq* 酶 (Clontech, France); PCR 仪 (2720, Applied Biosystems, UK); ABI 3130xl 基因分析仪 (Applied Biosystems, UK)。

1.2 总 DNA 提取

取第 2、4、9、15 代共培养上清液 5 mL 及第 9 代去除产甲烷菌的真菌培养液 5 mL, 13000 r/min 离心 5 min, 去除上清液后, 用 1 mL 磷酸缓冲液清洗沉淀, 然后 13000 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 沉淀用于 DNA 提取; 用于接种的瘤胃内容物 20 mg 提取 DNA。样品破壁过程除外 (珠磨仪上破壁 3 × 30 s, 中间在冰上放置 30 s), 其余步骤参照 BIO101 FastDNA SPIN DNA 提取试剂盒使用说明进行。

1.3 厌氧真菌核糖体内转录间隔区扩增序列长度多态性分析 (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA)

利用特异性引物 Neo 18S For (5'-6' FAMAATCCTTCGGATTGGCT-3') 和 Neo 5.8S Rev (5'-CGAGAACCAAGAGATCCA-3') 分别在厌氧真菌 18S rRNA 基因的末端和 5.8S rRNA 基因的前端, 因此扩增厌氧真菌 ITS1 全序列。PCR 反应混合液 (10 μL) 含 1 × PCR 反应缓冲液 (40 mmol/L KOH pH = 8.0, 16 mmol/L KCl, 3.5 mmol/L MgCl₂ 和 3.75 μg/mL BSA), dNTP 800 × mol/L, 上、下游引物 500 nmol/L, 50 × TITANIUM *Taq* 酶 0.2 μL 及模板 DNA (约 20 ng), PCR 反应条件为 95℃ 5min, 然后 10 个循环 95℃ 30 s, 68℃ (每个循环降 1℃) 30 s 及 72℃ 30 s; 接着 25 个循环 95℃ 30 s, 58℃ 30 s 及 72℃ 30 s, 最后 72℃ 延伸 6 min。每个样品设 3 个 PCR 重复, 2% 琼脂糖胶检测 PCR 产物, 产物长度约为 350~450 bp。

将每个样品的 3 个 PCR 产物混合,根据 PCR 产物的浓度,加水稀释 40 倍,稀释后的 PCR 产物 1 μL 与 0.25 μL GeneScan 500 LIZ 内标及 9.75 μL Hi-Di™ 甲酰胺混匀,95℃ 变性 5 min,冰上冷却,然后在 ABI 3130x1 基因分析仪上进行片段长度分析。各片段数据由 Genemapper 软件导出(含片段长度、片段的峰高、峰面积),然后导入 FingerprintingII 软件进行相似性分析。峰面积小于最大峰面积 1% 的片段被当作假阳性处理,相似性分析中予以排除,相似性分析采用 Pearson 方法。

2 结果

2.1 厌氧真菌 ARISA 分析方法的建立

特异性引物 Neo 18S For 在厌氧真菌 18S rRNA 基因的末端,Neo 5.8S Rev 在厌氧真菌 5.8S rRNA 基因的前端,能扩增厌氧真菌 ITS1 全序列,根据厌氧真菌种类不同,扩增产物片段长度为 350 ~ 450 bp。

本试验所用 3 个菌株 YC301、YC501 与 YC502 的 ARISA 图谱见图 1。厌氧真菌 YC301 得到长度为 389.67 bp 的片段;YC501 得到 4 个长度分别为 415.91、425.69、437.31 和 438.46 bp 的片段;YC502 得到 4 个长度分别为 415.87、425.69、437.37 和 438.41 bp 的片段,与 YC501 得到的片段长度基本一致,YC501 与 YC502 可能是同一株厌氧真菌。

2.2 厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌多样性分析

瘤胃内容物中厌氧真菌 ARISA 分析共得到 11 个片段,片段大小及峰面积分别为:354.63 (1044)、366.46 (23260)、370.89 (2968)、371.89 (3185)、373.63 (3809)、374.63 (3449)、389.41 (4718)、391.59 (27108)、413.80 (1819)、414.82 (2773) 和 415.94 bp (2748)。共培养液中所得到片段的大小及峰面积见表 1;共培养液第二代分别得到 16 个片段(其中 5 个片段较弱)、20 个片段(其中 6 个片段较

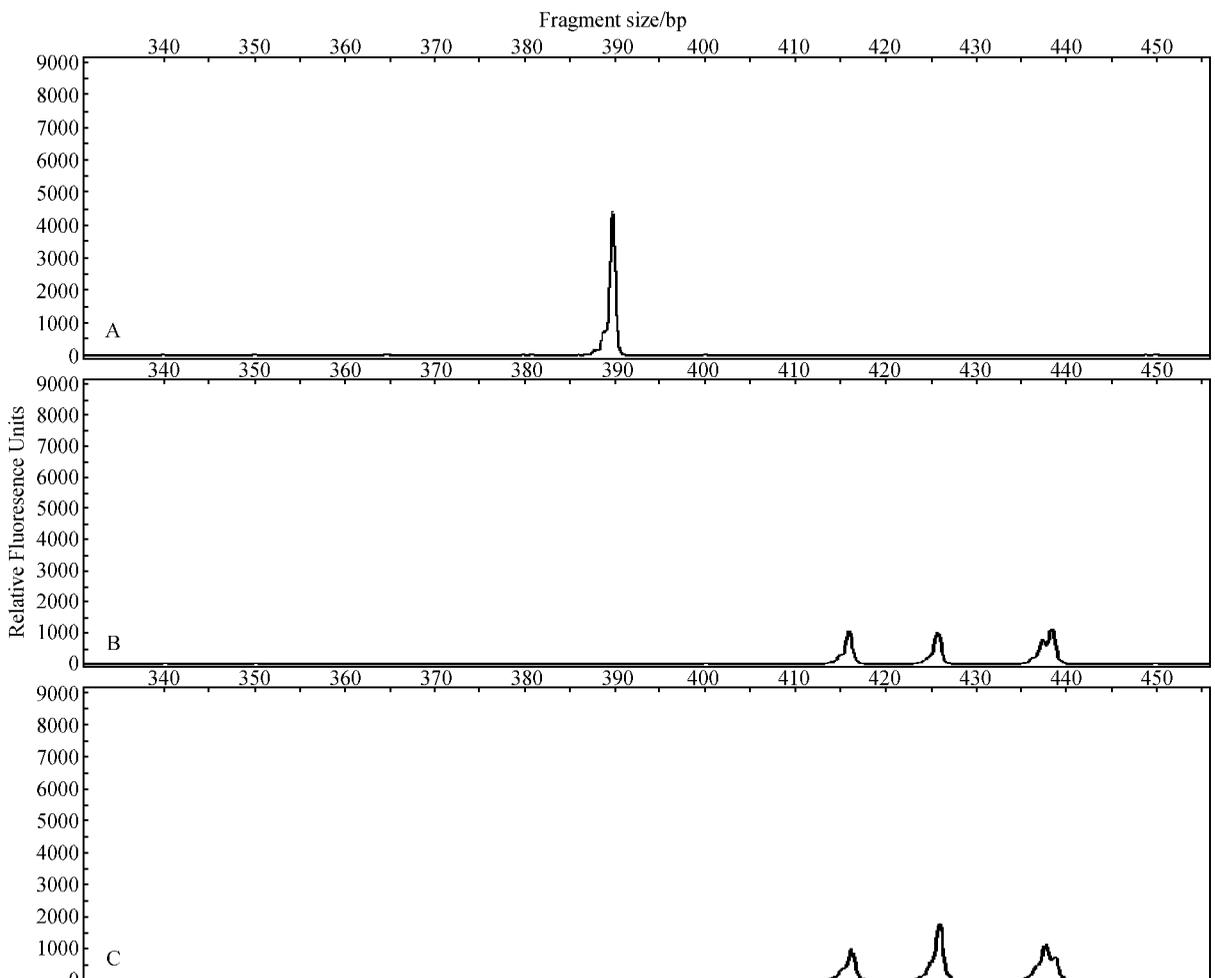


图 1 厌氧真菌菌株 ARISA 分析图谱

Fig. 1 ARISA analysis of anaerobic fungi isolates (A, YC301; B, YC501; C, YC502).

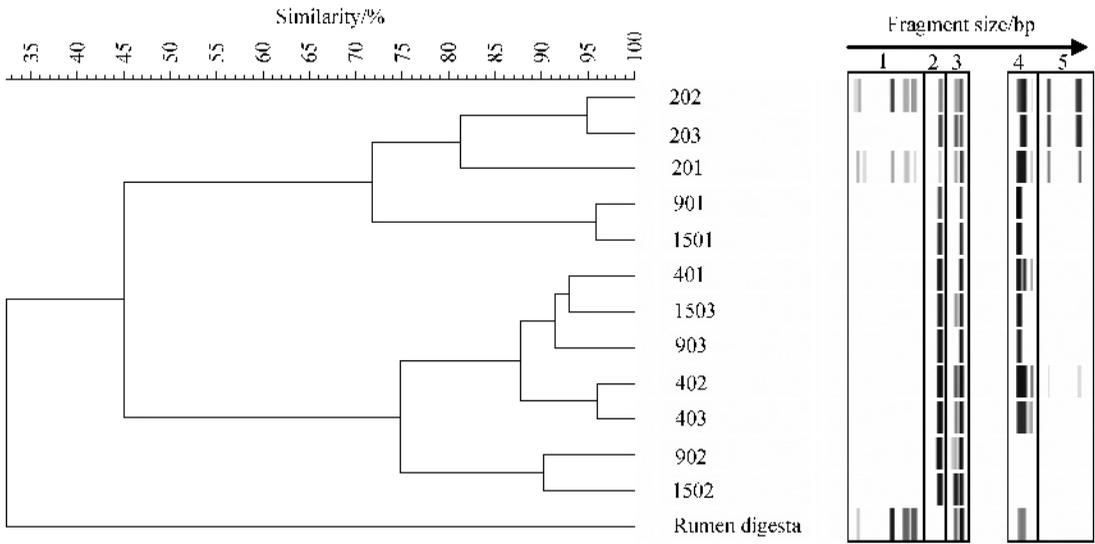


图 2 瘤胃内容物及共培养液中厌氧真菌相似性分析 (样品编号同上)

Fig.2 Sizes (A) and peak areas (B) of anaerobic fungi in the co-cultures with methangens analyzed by ARISA (Sample ID was the same as above).

表 1 共培养液中厌氧 ARISA 分析片段大小及峰面积

Table 1 Sizes and peak areas of anaerobic fungi in the co-cultures with methangens analyzed by ARISA

Sample ID	Size/bp ^b	Area	Sample ID	Size/bp	Area	Sample ID	Size/bp	Area
201 ^a	354.63	2348	202	366.51	9134	203	383.7	10169
	366.53	2859		371.87	1042		389.55	5411
	371.86	1046		373.61	1470		391.55	4474
	383.54	1209		374.62	1350		414.81	15599
	389.53	1610		383.62	3003		415.84	31812
	391.61	13683		389.55	2072		425.66	14265
	413.65	15644		390.6	1123		437.44	10673
	414.67	24291		391.55	4217		438.39	12107
	415.79	32052		413.70	3433			
	425.61	6262		414.83	11638			
	438.31	9111		415.85	22161			
				425.61	11964			
				437.32	9488			
		438.36	9532					
401	383.46	29070	402	383.55	56346	403	383.56	38615
	391.37	20753		389.47	5234		389.51	2745
	413.6	45108		391.46	36925		391.42	25144
	415.85	11219		413.66	40557		413.71	11156
	418.72	1235		414.79	28538		414.74	12471
				415.92	27044		415.87	12889
				418.8	2717		418.76	1298
				425.72	1105			
901	383.51	8340	902	383.36	46889	903	383.57	36527
	391.44	4361		389.37	1326		391.44	23918
	413.55	121618		391.36	30834		413.76	24245
1501	383.52	13876	1502	383.52	30237	1503	383.56	21394
	391.45	10799		389.46	17007		389.57	2125
	413.64	59605		391.45	19460		391.47	14638
						413.79	34559	

^a Sample ID 201, the first replicate of the second subculture. ^b The sizes corresponding area below 1000 were not shown.

弱和8个片段;共培养液第四代分别得到5、1(2)、(1)个片段;共培养液第九代分别得到3、4(1)、3个片段;共培养液第十五代分别得到3、3、4个片段。共培养液第二代的三个重复样品中均检测到长度约为383、389、391、414、415、425和438 bp的片段;第四代中均检测到长度约为383、391、413、415和418 bp的片段;第九代和第十五代中均检测到长度约为383和391 bp的片段。

相似性分析结果见图2。共培养液在体外传代培养过程中,厌氧真菌多样性降低,片段长度约为354~375 bp的厌氧真菌只在瘤胃内容物和共培养液第二代中检测到,而在第四代、九代及第十五代中没有检测到(图2矩形框1)。片段长度约为383 bp的厌氧真菌在瘤胃内容物中未能检测到,但在所有共培养液中都能检测到,在第二代的共培养液中这个条带比较淡,在第四代、第九代及第十五代的共培养液中条带变深(矩形框2)。片段约为389~391 bp的厌氧真菌在瘤胃内容物及所有共培养液样品中都

能检测到,并且是共培养液中厌氧真菌的优势菌株之一(矩形框3)。片段约为413~418 bp的厌氧真菌在瘤胃内容物及大部分共培养液中检测到,只有第二个重复的第九代与第十五代未能检测到(矩形框4)。片段长度为425~438 bp的厌氧真菌只能在共培养液的第二代中检测到,而在瘤胃内容物及其他共培养液中均未检测到(矩形框5)。结果显示,共培养液第二代中厌氧真菌种类较多但不稳定,一些真菌在后来的传代过程中消失;共培养液第四代至第十五代传代过程中,厌氧真菌种类比较稳定。

在传代过程中,每天测定共培养液中甲烷的产量,计算共培养液每代甲烷产量的总和。共培养液第二代、第四代、第九代及第十五代的甲烷总产量分别为 $17.4(\pm 1.1)$ mL、 $38.9(\pm 4.6)$ mL、 $46.7(\pm 5.1)$ mL和 $38.5(\pm 1.1)$ mL。

2.3 去除产甲烷菌后真菌多样性变化

共培养液经过3次传代后,除继续接种传代共培养液外,另外接种10 mL培养液于添加氯霉素的

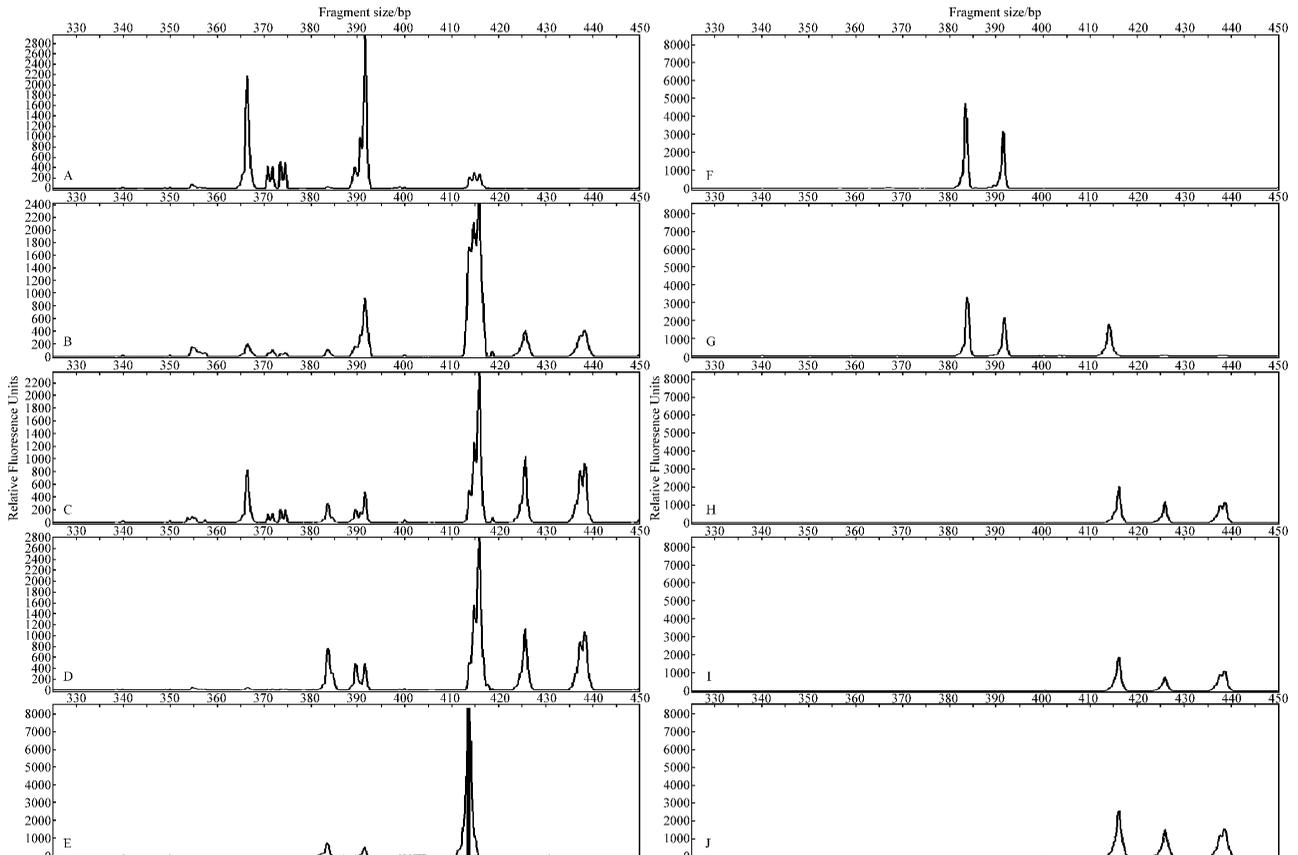


图3 瘤胃内容物(A)、共培养液第二代(B、C、D)、第九代(E、F、G)及厌氧真菌培养液(H、I、J)中厌氧真菌的多样性比较

Fig.3 Diversity analysis of anaerobic fungi in rumen digesta (A), the 2nd (B, C, D) and 9th (E, F, G) co-cultures with methanogens and the 9th (H, I, J) anaerobic fungal co-cultures without methanogens.

90 mL 液体培养基中生长, 去除共培养液中的产甲烷菌, 得到厌氧真菌培养液(未检测到甲烷生成), 厌氧真菌培养液与共培养液同时传代培养。瘤胃接种物, 共培养液第二代与第九代及厌氧真菌培养液第九代中厌氧真菌 ARISA 分析结果见图 3。瘤胃接种物与共培养液第二代中厌氧真菌复杂多样, 至共培养液第九代, 所能检测到的厌氧真菌片段长度为 383.51、391.44 和 413.55 bp。而去除产甲烷菌的厌氧真菌培养液第九代中则检测到四个片段, 大小分别为 415.80、425.66、437.46 和 438.47 bp。对于第九代培养液, 共培养液中检测到的厌氧真菌种类在去除甲烷菌的厌氧真菌培养液中没有检测到, 而厌氧真菌培养液中检测到的厌氧真菌种类则在共培养液中未检测到。结果显示: 共培养液与厌氧真菌培养液第九代中检测到的厌氧真菌种类完全不同, 有甲烷菌存在时, 共培养液中检测到的厌氧真菌 ITS1 序列较短, 而没有甲烷菌存在时, 厌氧真菌培养液中检测到的厌氧真菌 ITS1 序列较长。

3 讨论

自 1975 年, Orpin 首次发现瘤胃中带鞭毛的游动孢子为严格厌氧的真菌后^[8], 国内外学者相继从草食动物的消化道及粪样中分离出多种厌氧真菌^[9-11], 共计 6 个属 16 个种之多^[12]。目前, 厌氧真菌的鉴定主要依据游动孢子的超显微结构, 也有研究利用分子生物学方法对厌氧真菌进行鉴定^[2,4,9]。但人们对草食动物消化道内厌氧真菌多样性的了解还非常有限, 已有报道多局限于通过体外培养技术来反映瘤胃内厌氧真菌的多样性。由于很多真菌不能在体外培养中生长^[13], 因此利用免培养分子生物学手段如基因探针、DGGE、TGGE、RFLP 等方法研究厌氧真菌多样性成为新的焦点。van Elsas 等利用变性梯度凝胶电泳分析了土壤中真菌菌群的变化, 并比较了不同 18S rRNA 基因引物对样品中真菌的扩增效果^[13]。Borneman 等设计了两对扩增土壤样品中真菌 18S rRNA 基因的引物, 并利用 SSCP 分析了土壤样品中真菌的多样性^[14]。然而 Li 等在利用 18S rRNA 基因分析厌氧真菌分类时发现, 厌氧真菌 18S rRNA 基因相似性很高 (> 97%), 不能有效区别不同种类厌氧真菌^[15]。多数报道则是利用真菌 ITS 序列长度多态性分析环境样品中真菌的多样性。Ranjard 等利用真菌 ITS1 与 ITS2 序列长度多态性分

析了土壤样品中真菌的多样性^[16], Manter 等利用 ITS1 至 ITS4 的长度多态性建立了真菌多样性分析的 LH-qPCR 方法^[17]。Nicholson 等利用厌氧真菌 ITS1 序列长度多态性建立了厌氧真菌 DGGE, Spreadex 电泳等多样性分析方法, 但这些方法都不能有效分离长度差异小于 1 bp 的片段^[5]。本文根据厌氧真菌 ITS1 序列长度多态性, 结合能分离片段长度小于 1 bp 的毛细管电泳, 建立了厌氧真菌多样性分析方法。结果显示, 该方法能快速有效地分离不同长度的厌氧真菌 ITS1 序列, 并结合软件分析能比较形象地反映不同样品真菌多样性, 因此是研究厌氧真菌多样性的一种较好的方法。

本研究利用 ARISA 方法检测了来自于瘤胃内容物的厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌的多样性。研究表明, 某些片段(图 2 矩形框 2 和 5)在瘤胃内容物样品中没有检测到, 但在共培养液中检测到了, 这可能由于相应片段的厌氧真菌在瘤胃内容物中所占的比例较小, 没有达到 PCR 检测的极限, 因而未能扩增到相应的片段, 但这些厌氧真菌在共培养液中得到富集。第九代和第十五代的共培养液第二个重复(902, 1502)中未检测到片段长度约为 413~418 bp 的厌氧真菌(图 2 矩形框 4), 因此, 这种厌氧真菌可能在这两个共培养液(902, 1502)的传代过程中消失了, 但该片段在共培养液第九代和第十五代的另外两个重复(901, 903, 1501, 1503)中检测到, 由此推断, 这种厌氧真菌能在体外共培养液中生长成为优势菌, 而其在共培养液第九代和第十五代(902, 1502)中的消失是偶然的。Edwards 等^[18]利用厌氧真菌长度多态性研究了瘤胃内厌氧真菌对牧草的定植过程, 结果表明, 真菌在 5 min 内附着于牧草上, 随着时间增加, 附着于牧草上的真菌种类逐渐增多, 30 min 内形成一个稳定的区系, 直到 30 h 后, 这个稳定的区系也没有变化。

成艳芬等^[1]在研究厌氧真菌与产甲烷菌共培养液时指出, 厌氧真菌降解底物为甲烷菌生长提供了良好的基质, 因此甲烷菌能在每三天传代一次的共培养液中生长良好。本研究发现, 产甲烷菌也反过来影响了共培养液中的厌氧真菌, 产甲烷菌存在与不存在时, 所检测到的厌氧真菌种类完全不同。本研究中去除产甲烷菌的厌氧真菌培养液 ARISA 分析图谱与厌氧真菌菌株 YC50K(YC502)相似, 由此推断, 类似于 YC501 的厌氧真菌菌株可能是厌氧真菌

培养液中的优势菌,该培养液中存在的其他厌氧真菌都不能检测到。在厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌 ARISA 分析图谱的第二个片段与 YC301 菌株的 ITS1 片段比较接近,但它们之间还是相差约 2 个碱基,不是同一个厌氧真菌。另外,在本实验室拥有的近 20 株厌氧真菌中,没有找到与共培养液中的厌氧真菌(根据 ARISA 图谱判断)相似的菌株。我们曾试图利用厌氧滚管技术分离培养共培养液中的厌氧真菌菌株,但所分离培养到的若干厌氧真菌菌株,均相似于 YC301 或 YC501,并且这些菌株在以稻草为基质的培养基中生长都能产生甲烷,这说明传统的厌氧滚管技术并未能将共培养液中的厌氧真菌与产甲烷菌分开;而共培养液中厌氧真菌的 ARISA 图谱上其他片段(383.51、391.44 和 413.55 bp)所代表的厌氧真菌菌株未能分离培养到。这些片段所代表的厌氧真菌可能与产甲烷菌存在某种特殊的相关关系,在没有产甲烷菌存在时这些厌氧真菌也不能生长,或者这些厌氧真菌不能在琼脂糖滚管中生长。总体来说,瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌共培养液中厌氧真菌的生长促进了产甲烷菌的生长,并且产生未知生长因子促进某些未知产甲烷菌的生长^[1]。本研究室迄今为止的研究表明,这些未知产甲烷菌在去除厌氧真菌后不能生长,而本研究结果则显示产甲烷菌的存在丰富了共培养液中真菌的种类,在去除产甲烷菌后,某些厌氧真菌也随之消失,这些结果提示,瘤胃中的产甲烷菌与厌氧真菌可能存在某种紧密的相互关系(如互营关系)或者瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌间的关系相似于瘤胃原虫与产甲烷菌间的相互关系,即产甲烷菌紧密附着于厌氧真菌的某些部位,这也能合理的解释滚管分离培养的厌氧真菌菌株发酵产生甲烷,但瘤胃厌氧真菌与产甲烷菌的相互关系还有待进一步研究。

综上所述,本研究建立了能较快速有效地分析厌氧真菌多样性的 ARISA 方法,但研究发现,去除共培养体系中的甲烷菌可影响厌氧真菌菌群结构,因此提示,瘤胃中产甲烷菌与厌氧真菌密切相关,但是两者之间关系机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 成艳芬,毛胜勇,裴彩霞,等. 共存与厌氧真菌分离培养液中瘤胃甲烷菌的检测及其多样性分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(6): 879 - 883.

- [2] Li J, Heath BI, Packer L. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of Neocallimasticales ord. nov. . *Canadian Journal of Botany* , 1993, 71 : 393 - 407.
- [3] Brookman JL, Mennim G, Trinci APJ, et al. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology-SGM* , 2000, 146 : 393 - 403.
- [4] Tuckwell DS, Nicholson MJ, McSweeney CS, et al. The rapid assignment of ruminal fungi to presumptive genera using ITS1 and ITS2 RNA secondary structures to produce group-specific fingerprints. *Microbiology-SGM* , 2005, 151 : 1557 - 1567.
- [5] Nicholson MJ. Molecular characterization of anaerobic gut fungi and their colonization of plant material in the rumen. University of Manchester, PhD thesis, 2003.
- [6] 朱伟云,毛胜勇,王全军,等. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究. 南京农业大学学报(*Journal of Nanjing Agricultural University*) 2001, 24 : 44 - 48.
- [7] Bryant MP, Burkey LA. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* , 1953, 36 : 205 - 217.
- [8] Orpin CG. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of Genetic Microbiology* , 1975, 91 : 249 - 262.
- [9] Theodorou MK, Zhu WY, Rickers A, et al. Biochemistry and ecology of anaerobic fungi. //Howard DH & Miller JD. *The Mycota : VI Human and Animal Relationship*. New York : Springer-Verlag, 1996, 265 - 295.
- [10] Orpin CG, Joblin KN. The rumen anaerobic fungi. //Hobson PN & Stewart CS. *The Rumen Microbial Ecosystem*. London, U K : Blackie Academic & Professional, 1997, 140 - 196.
- [11] Ozkose E, Thomas BJ, Davies DR, et al. *Cyllumyces aberensis* gen. nov. sp. nov. , a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany* , 2001, 79 : 666 - 673.
- [12] 朱伟云. 瘤胃微生物. //冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京 : 科学出版社, 2004, 1 - 130.
- [13] van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolters AC, et al. Analysis of the dynamics of fungal community in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* , 2000, 43 : 133 - 151.

- [14] Borneman J , Hartin RJ . PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66 : 4356 – 4360 .
- [15] Li JL and Heath IB The phylogenetic-relationships of the anaerobic Chytridiomycetous gut fungi(Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota . I . Cladistic-analysis of ribosomal-RNA sequences. *Canadian Journal of Botany* , 1992 , 70 (9) : 1738 – 1746 .
- [16] Ranjard L , Poly F , Lata JC , et al . Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints : biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 , 67 : 4479 – 4487 .
- [17] Manter DK , Vivanco JM . Use of the ITS primers , ITS1F and ITS4 , to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* , 2007 , 71 : 7 – 14 .
- [18] Edwards JE , Kingston-Smith AH , Jimenez HR , et al . Characterisation of the dynamics of initial anaerobic fungal colonisation of non-conserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* , 2008 66 535 – 545 .

Diversity analysis of anaerobic fungi in the co-cultures with or without methanogens by amplified ribosomal intergenic spacer analysis

Yanfen Cheng , Weiyun Zhu*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract [Objective] A molecular-based approach for anaerobic fungal community analysis was developed. The diversity of anaerobic fungi in the co-cultures with or without methanogens was analyzed by amplified ribosomal intergenic spacer analysis.

[Methods] Co-cultures of anaerobic fungi and methanogens were obtained from rumen digesta using anaerobic fungal medium and the addition of penicillin and streptomycin and ampicillin alternatively and then subcultured 15 times by transferring cultures every 3 d separately for each replicate. At the end of the third subcultures , the co-cultures were inoculated to another bottles adding with chloramphenicol to obtain fungal cultures without methanogens. Total DNA from the original rumen digesta and subcultured co-cultures and fungal cultures was used for amplified ribosomal intergenic spacer analysis. **[Results]** The diversity of anaerobic fungi decreased corresponding with the subculture of the co-cultures. The anaerobic fungi represented by 354-375 and 425-438 bp in the amplified ribosomal intergenic spacer analysis profiles were not detected in the co-cultures after the second subcultures and the anaerobic fungi represented by 383 , 389-391 and 413-418 bp were dominant along with the subcultures. The community of anaerobic fungi was different in the co-cultures with or without methanogens. The anaerobic fungi represented by 383.51 , 391.44 and 413.55 bp in the amplified ribosomal intergenic spacer analysis profiles were dominant in the co-cultures with methanogens , while the anaerobic fungi represented by 415.80 , 425.66 , 437.46 and 438.47 bp were dominant in the co-cultures without methanogens. **[Conclusion]** The molecular-based approach amplified ribosomal intergenic spacer analysis was suitable for analysis of anaerobic fungi in the environmental samples. The diversity of anaerobic fungi decreased along with the subculture of the co-cultures and the anaerobic fungal community became stable after the 4th subculture of the co-cultures. The anaerobic fungal community was different in the co-cultures with or without methanogens.

Keywords : anaerobic fungi ; methanogens ; amplified ribosomal intergenic spacer analysis

(本文责编 : 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30530560)

* Corresponding author. Tel : + 86-25-84395523 ; Fax : + 86-25-84395314 ; E-mail : zhuweiyunnjau@hotmail.com

Received : 27 November 2008 / Revised : 4 January 2009