

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11): 1344–1352; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.012

亚成体大熊猫肠道真菌多样性

艾生权^{1#}, 钟志军^{1#}, 彭广能^{1*}, 王承东^{2#}, 罗永久¹, 何廷美², 谷武阳¹, 李才武²,
李刚诗¹, 吴虹林², 刘学涵¹, 夏玉¹, 刘艳红¹, 周潇潇¹

¹ 四川农业大学动物医学院, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014

² 中国林业科学研究院大熊猫研究中心四川雅安碧峰峡基地, 四川 雅安 625007

摘要: 【目的】分析 5 只亚成体大熊猫肠道真菌的多样性。【方法】采用基于 ITS 基因的 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 方法, 对肠道真菌总 DNA 进行 ITS-RFLP 分析, 构建 ITS 克隆文库, 然后用 *Hha*I、*Hae*III 进行酶切指纹图谱分析, 测序并绘制系统进化树。【结果】研究表明, 5 只亚成体大熊猫肠道真菌主要由 *Ascomycota* (平均占 46.24%)、*Basidiomycota* (平均占 15.79%) 2 个门和一些未分类 (平均占 29.14%)、未培养 (平均占 8.83%) 的真菌。其中, *Ascomycota* 主要以 *Saccharomycetes* (平均占 63.74%) 和 *Dothideomycetes* (平均占 35.91%) 2 个纲为主; *Basidiomycota* 主要以 *Tremellomycetes* (平均占 65.80%) 和 *Microbotryomycetes* (平均占 33.15%) 2 个纲为主。而这 4 个纲分别则主要以 *Candida*、*Debaryomyces*; *Pleosporales*、*Myriangium*; *Cystofilobasidium*、*Trichosporon*; *Leucosporidium*、*Leucosporidiella* 八个菌属为主, 各样品中所占比例不等。【结论】亚成体大熊猫肠道内存在一定比例的真菌菌群, 且 ITS-RFLP 技术能够很好地对其多样性进行分析。真菌的发现扩大了我们大熊猫肠道微生物结构的了解, 同时也有助于我们进一步研究真菌能否帮助大熊猫消化高纤维素食物。

关键词: 大熊猫, ITS 序列, 多样性, 肠道真菌, RFLP 分析

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1344-09

大熊猫属我国濒危珍稀动物, 其肠道正常菌群是维持大熊猫肠道微生态平衡的一群微生物, 它们与宿主的营养、代谢、免疫及发育等方面紧密相关^[1-2]。因肠道菌群失调造成其微生态失衡而引起一系列肠道疾病是大熊猫致死的主要原因之一^[3]。肠道微生物中大部分是细菌, 也有一些真菌^[4]。目

前, 对大熊猫肠道微生态的研究大部分见于细菌多样性方面^[5-7], 未见运用分子生物学方法针对其肠道真菌多样性的研究。

通过传统培养的方法, 仅有少量的肠道真菌类群能被分离到^[8], 而运用分子生物学技术则可更全面地反应大熊猫肠道真菌的多样性。真菌核糖体

基金项目: 国家自然科学基金 (31272620); 教育部“长江学者和创新团队发展规划”创新团队项目 (IRT0848)

* 通信作者。Tel: +86-835-2885312; E-mail: pgn.sican@163.com

作者简介: #共同第一作者。艾生权 (1988–), 男, 四川资中人, 临床兽医学硕士研究生, 主要从事动物疾病防治研究, E-mail: aishengquan@126.com; 钟志军 (1980–), 男, 四川双流人, 博士, E-mail: zhongzhijun488@126.com; 王承东 (1978–), 男, 四川安岳人, 工程师, E-mail: wonderveter@aliyun.com

收稿日期: 2014-02-17; 修回日期: 2014-06-20

RNA (rRNA) 在其基因组中具有多个拷贝, 内部存在供设计引物的保守区域, 其中 ITS 区不加入成熟核糖体, 受选择压力较少, 进化速度较快, 进化信息较多, 为中度保守区, 而 18S、5.8S 和 28S rRNA 为高度保守区, 因此能更方便的设计上下游引物进行 ITS 区的扩增^[9]。目前, 最常用的微生物多样性分析手段主要是基于指纹图谱分析的 RFLP (基因限制性片段长度多态性)、TGGE (温度梯度凝胶电泳)、DGGE (变性梯度凝胶电泳)、PFGE (脉冲场凝胶电泳)、RAPD (随机扩增多态性技术)、AFLP (扩增片段长度多态性分析)、FSH (荧光原位杂交) 等技术。ITS-RFLP 技术由于其操作简单快捷, 数据可靠, 适合于对微生物种群的 ITS 片段进行筛选、鉴定, 因此广泛应用于种类、系统发育关系等方面的分析^[10-12]。本实验采用 ITS-RFLP 技术对亚成体大熊猫肠道真菌多样性进行分析, 旨在了解亚成体大熊猫肠道真菌的多样性和优势菌群, 扩大我们对大熊猫肠道微生物结构的了解。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

EZNA Fungal DNA Miniprep Kit: Omega Bio-Tek 公司产品; PCR 试剂、琼脂糖凝胶回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α : 北京天根生化科技有限公司产品; DNA 分子质量标准、pMD19-T Vector、限制性内切酶 *Hha*I、*Hae*III: 大连宝生物工程有限公司产品; ITS 区真菌通用引物、载体引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 样品采集

雅安碧峰峡大熊猫基地 5 只亚成体大熊猫彩陶 (缩写为 CT, ♂, 2 岁)、运运 (缩写为 YY, ♂, 3.5 岁)、姚欣 (缩写为 YX, ♀, 3.5 岁)、壮妹 (缩写为 ZM, ♀, 4.5 岁)、新妮儿 (缩写为 XN, ♀, 5.5 岁), 于 2013 年 3 月 10 日 (样品号: CT、YY、YX、ZM、XN) 取新鲜粪便避开外部杂菌污染区对其中部进行无菌采集储于冰盒, 立即送实验室进行处理。

1.3 粪便真菌总 DNA 提取

取 100 g 粪便 (内外、四周均匀采取) 于无菌烧杯中, 加入 200 mL 灭菌 PBS, 玻棒搅匀后过滤残渣, 将液体倒入无菌烧杯中, 残渣再用 100 mL PBS 清洗, 收集 2 次液体, 分装于 200 mL 离心管中, 漩涡振

荡 8 min 后, 低速 (200 \times g) 离心 3 min, 收集上清液, 再高速 (4000 \times g) 离心 5 min, 收集沉淀, 用 PBS (依菌体沉淀量而定) 悬浮沉淀, 高速 (4000 \times g) 离心 5 min, 收集沉淀并用 PBS 悬浮沉淀, 于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。将预处理样品在液氮和沸水中反复冻融 5 次后, 参照 EZNA Fungal DNA Miniprep Kit 说明书提取真菌总 DNA, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 真菌 ITS 片段的 PCR 扩增与纯化

以真菌总 DNA 为模板, 用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。反应体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L, ITS1 和 ITS4 各 1 μ L, 模版 DNA 1 μ L, 灭菌双蒸水补至 20 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 结束反应。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 根据琼脂糖凝胶回收试剂盒的操作说明对 PCR 产物进行纯化。

1.5 ITS 基因文库的构建

将纯化后的 ITS 片段与 pMD19-T Vector 载体连接, 通过热激法转化到 DH5 α 。以氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 抗性和菌液 PCR 电泳来筛选阳性克隆子, 阳性克隆子的 PCR 检测则用 T 载体通用引物 M13F-47 (5'-GCCAGGCTTTTCCCAGTCACGA-3') 和 M13R-48 (5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 来进行插入片段的扩增。

1.6 限制性片段长度多态性分型

将检测获得的阳性克隆子的 PCR 产物分别用限制性内切酶 *Hha*I 和 *Hae*III 进行 RFLP 分析, 酶切产物经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳。根据该图谱分别对每一个文库中的所有克隆进行分型, 图谱相同的克隆作为一个分类操作单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)。

1.7 文库的统计分析

采用 α 多样性的测度, 选用覆盖率 (Coverage value, C), 物种丰富度指数 (E), 香农指数 (Shannon Index, H'), 辛普森指数 (Simpson Index, D), Pielou 均匀度指数 (J_{sw}), Chaol 物种多样性指数 (S_{Chaol}) 对 ITS 克隆文库进行微生物多样性评价^[13-15]。

1.8 测序及序列分析

每个样品的文库中属于同一个 OTU 的克隆选一个代表进行测序, 测序工作由上海英俊生物技术

有限公司完成。测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索。选取相似程度最高的序列，采用 MEGA 5.2 软件的邻近相接法 (NJ) 对每个样品中优势菌株绘制系统进化树。

2 结果

2.1 真菌 ITS 序列的 PCR 扩增

采用 EZNA Fungal DNA Miniprep Kit 成功提取总 DNA 进行 PCR 扩增，经纯化后获得较好的扩增条带，扩增产物大小约 600 bp，且无非特异性扩增，扩增的 PCR 产物适合进行 ITS 克隆文库的建立，见图 1。

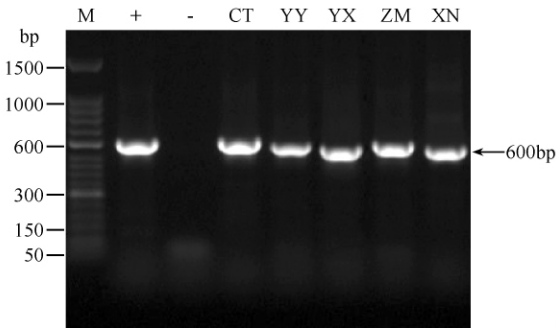


图 1. 5 只亚成体大熊猫肠道真菌 ITS 序列扩增结果
Figure 1. Amplification of intestinal fungal ITS sequences from five sub-adult pandas. M: 50 bp DNA ladder maker; + : Positive control; - : Negative control; CT、YY、YX、ZM、XN: PCR products from the intestinal fungal of five sub-adult pandas.

2.2 ITS 克隆文库分析

从转化的平板上随机挑取 120 个克隆进行分析，CT、YY、YX、ZM、XN 分别获得 105、113、107、101、106 个阳性克隆子，阳性率分别为 87.5%、94.2%、89.2%、84.2%、88.3%。用限制性内切酶

Hha I 和 *Hae* III 对阳性克隆子的 PCR 扩增产物进行酶切，根据酶切片段大小和数量对条带图谱 (图 2) 分型，结果表明在 CT、YY、YX、ZM、XN 的肠道 ITS 文库中分别分出 27、27、18、31、27 个 OTUs。对其进行多样性分析 (表 1)，构建的文库覆盖率均在 80% 以上，表明所构建的文库涵盖了亚成体大熊猫肠道的大部分真菌种类；物种丰富度指数 (E) 均在 0.25 左右，香农指数 (H') 均在 2.57 左右，辛普森指数 (D) 均在 0.11 左右，表明亚成体大熊猫肠道真菌的多样性信息比较丰富；Pielou 均匀度指数 (J_{sw}) 均在 0.79 左右，表明亚成体大熊猫肠道真菌群落分布的均匀度较好；根据 $Chao1$ 物种多样性指数 (S_{Chao1}) 预测，亚成体大熊猫肠道大概有 23 – 67 类真菌。

2.3 RFLP 分析

将 CT、YY、YX、ZM、XN 文库中属于同一个 OTU 的克隆随机选一个代表菌进行测序，去除载体序列，将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 同源性检索，选取相似度最高的序列。结果显示，5 只亚成体大熊猫肠道真菌主要由 *Ascomycota* (平均占 46.24%)、*Basidiomycota* (平均占 15.79%) 两个门和一些未分类 (平均占 29.14%)、未培养 (平均占 8.83%) 的真菌 (图 3)。其中，*Ascomycota* 主要以 *Saccharomycetes* (平均占 63.74%) 和 *Dothideomycetes* (平均占 35.91%) 两个纲为主；*Basidiomycota* 主要以 *Tremellomycetes* (平均占 65.80%) 和 *Microbotryomycetes* (平均占 33.15%) 两个纲为主。而这 4 个纲分别则主要以 *Candida*、*Debaryomyces*、*Pleiosporales*、*Myriangium*；*Cystofilobasidium*、*uncultured Trichosporon*；*Leucosporidium*、*Leucosporidiella* 八个菌属为主，在各样品中所占比例不等 (表 2)。

表 1. 5 只亚成体大熊猫肠道真菌 ITS 克隆文库的多样性分析结果

Table 1. Result of diversity analysis of ITS clone library from the intestinal fungal of five sub-adult pandas

sample	total clones	OTUs	C / %	E	J_{sw}	H'	D	S_{Chao1}
CT	105	27	83.82	0.26	0.78	2.57	0.11	61.53
YY	113	27	86.73	0.24	0.69	2.29	0.18	44.71
YX	107	18	93.54	0.17	0.81	2.35	0.11	23.47
ZM	101	31	83.21	0.31	0.84	2.90	0.07	58.54
XN	106	27	84.93	0.25	0.81	2.68	0.09	67.89

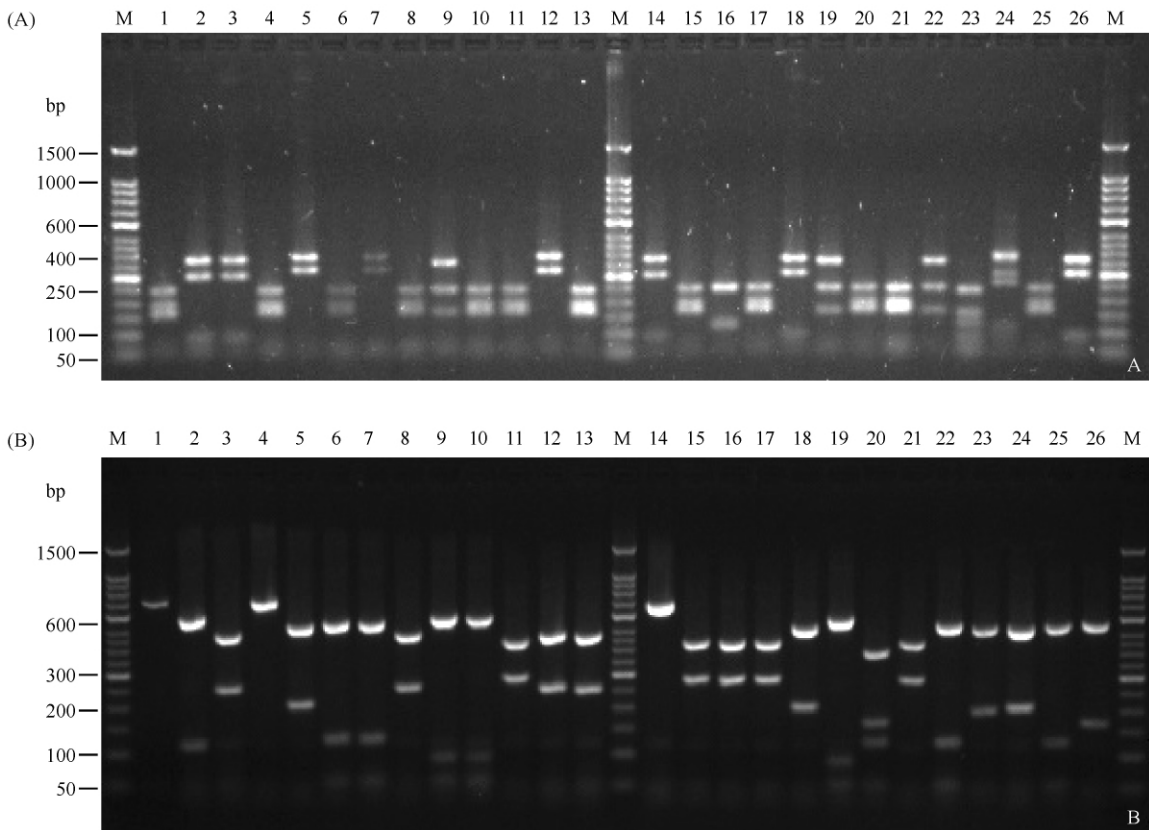


图 2. PCR 产物经 *Hha* I(A) 和 *Hae* III(B) 酶切后的部分酶切图谱

Figure 2. Partial result of PCR products digested by *Hha* I(A) and *Hae* III(B). M:50 bp DNA ladder maker; A: lane 1 – 26:PCR products from the intestinal fungal of five sub-adult pandas digested by *Hha* I; B: lane 1 – 26:PCR products from the intestinal fungal of five sub-adult pandas digested by *Hae* III.

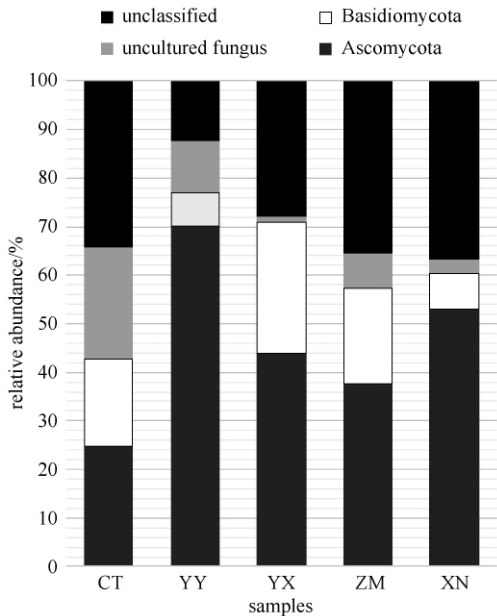


图 3. 5 只亚成体大熊猫肠道真菌群落组成

Figure 3. Composition of intestinal fungal community from five sub-adult pandas.

2.4 系统发育分析

采用 MEGA 5.2 软件的邻近相接法 (NJ) 对 5 只亚成体大熊猫样品中优势菌株序列进行系统发育分析,结果显示:5 只亚成体大熊猫肠道真菌主要由 *Ascomycota* 和 *Basidiomycota* 2 个门和一些未分类、未培养的真菌组成。其中 *Ascomycota* 下属的 *Saccharomycetes* 主要由 YY-36、YX-2、YX-4、YX-5、YX-23、YX-27、YX-55、ZM-4、ZM-5、ZM-9、XN-1、XN-3、XN-4 聚为一类, *Dothideomycetes* 主要由 CT-23、CT-95、YY-2、YY-4 聚为一类; *Basidiomycota* 下属的 *Tremellomycetes* 主要由 CT-9、ZM-16、XN-6 聚为一类, *Microbotryomycetes* 主要由 CT-24、CT-38、YX-3、ZM-21、ZM-23、ZM-84 聚为一类(图 4),该结果与表 2 结果类似,从而得以进一步验证。

表 2. 5 只亚成体大熊猫肠道内优势菌株的序列分析结果

Table 2. Results of sequence analysis of predominant strains from the intestines of five sub-adult giant pandas

samples	clones	in	OTUs'	clones	in	reference	maximum	ITS
No.	accession No.	OTUs	total clones /%	closest of NCBI match	accession No.	identity /%	size /bp	
CT-2	KJ081122	36	34. 29	<i>fungal</i> sp. APA-2013	KF212214	99	637	
CT-13	KJ081125	35	33. 33	uncultured fungus	JX546602	99	628	
CT-9	KJ081124	11	10. 48	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	JQ769324	99	579	
CT-5	KJ081123	7	6. 67	uncultured fungus	JX984720	99	602	
CT-38	KJ081128	3	2. 86	<i>Leucosporidium scottii</i>	AM117830	100	569	
CT-23	KJ081126	2	1. 90	<i>Pleosporales</i> sp. zzz714	HQ696074	99	591	
CT-24	KJ081127	2	1. 90	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	NR_073287	95	626	
CT-95	KJ081129	2	1. 90	<i>Myriangium</i> sp. UFMG-BRO197	JX268524	93	520	
YY-2	KJ081144	70	61. 95	<i>Pleosporales</i> sp. JP151	AB255289	94	575	
YY-19	KJ081147	7	6. 19	uncultured fungus	AB520277	99	908	
YY-43	KJ081149	6	5. 31	uncultured <i>Trichosporon</i>	HM136684	99	543	
YY-4	KJ081145	5	4. 42	<i>Pleosporales</i> sp. zzz1429	HQ696060	99	545	
YY-46	KJ081150	3	2. 65	uncultured fungus	AB426763	92	353	
YY-10	KJ081146	2	1. 77	<i>fungal</i> sp. R74-7	AB693784	99	495	
YY-36	KJ081148	2	1. 77	<i>Nemania diffusa</i>	GU292817	100	578	
YX-3	KJ081137	28	26. 17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KC816557	99	606	
YX-6	KJ081140	26	24. 30	<i>fungal</i> sp. APA-2013	KF212214	100	637	
YX-5	KJ081139	21	19. 63	<i>Debaryomyces hansenii</i>	FR870476	99	623	
YX-27	KJ081142	18	16. 82	<i>Candida saitoana</i>	HQ652067	100	614	
YX-4	KJ081138	4	3. 74	<i>fungal</i> sp. 2597 YZ-2011	HM439574	100	557	
YX-23	KJ081141	3	2. 80	<i>Debaryomyces hansenii</i>	GQ913348	100	618	
YX-2	KJ081136	2	1. 87	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JX069771	99	1117	
YX-55	KJ081143	2	1. 87	<i>Candida aff. saitoana</i> VKPM Y3988	HG007840	99	1088	
ZM-1	KJ081151	35	34. 65	<i>fungal</i> sp. APA-2013	KF212214	100	637	
ZM-4	KJ081152	14	13. 86	<i>Candida solani</i>	HM156501	98	470	
ZM-9	KJ081154	11	10. 89	<i>Debaryomyces hansenii</i>	GQ913348	99	618	
ZM-5	KJ081153	7	6. 93	<i>Candida saitoana</i>	HQ652067	100	614	
ZM-16	KJ081155	6	5. 94	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	JQ769324	99	579	
ZM-21	KJ081156	2	1. 98	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	NR_073287	98	626	
ZM-23	KJ081157	2	1. 98	<i>Leucosporidium scottii</i>	AM117830	100	569	
ZM-84	KJ081158	2	1. 98	<i>Leucosporidiella</i> sp. 131209-E2A-C3-II-lev	JN197600	100	566	
XN-7	KJ081134	37	34. 91	<i>fungal</i> sp. APA-2013	KF212214	99	637	
XN-1	KJ081130	20	18. 87	<i>Candida solani</i>	HM156501	98	470	
XN-3	KJ081131	15	14. 15	<i>Debaryomyces hansenii</i>	GQ913348	99	618	
XN-4	KJ081132	10	9. 43	<i>Debaryomyces hansenii</i>	FR870476	99	623	
XN-6	KJ081133	8	7. 55	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	NR_073232	100	618	
XN-27	KJ081135	8	7. 55	<i>Candida saitoana</i>	HQ652067	99	614	

3 讨论

大熊猫为珍稀动物,只允许对其进行非损伤性采样,所以仅能采集粪便作为研究对象。为此,我们取新鲜粪便避开外部杂菌污染区对其中部进行无菌采集储于冰盒,立即送回实验室进行粪便真菌总DNA的提取,以防菌群增殖或被杂菌污染。

从粪便样品中提取纯度高、质量好的菌群总DNA是肠道微生物生态学研究的基础,但受其中杂质的影响,难度较大。且真菌是真核生物,细胞壁比原核生物的壁厚10倍左右,使得从粪便中提取真菌DNA的难度远大于细菌DNA^[16-17]。目前,国内外从粪便中提取真菌DNA的方法主要有CTAB法、SDS法、Chelex-100法以及Fast DNakit (Bio101); Quantum PrepAqapure Genomic DNA isolation kit

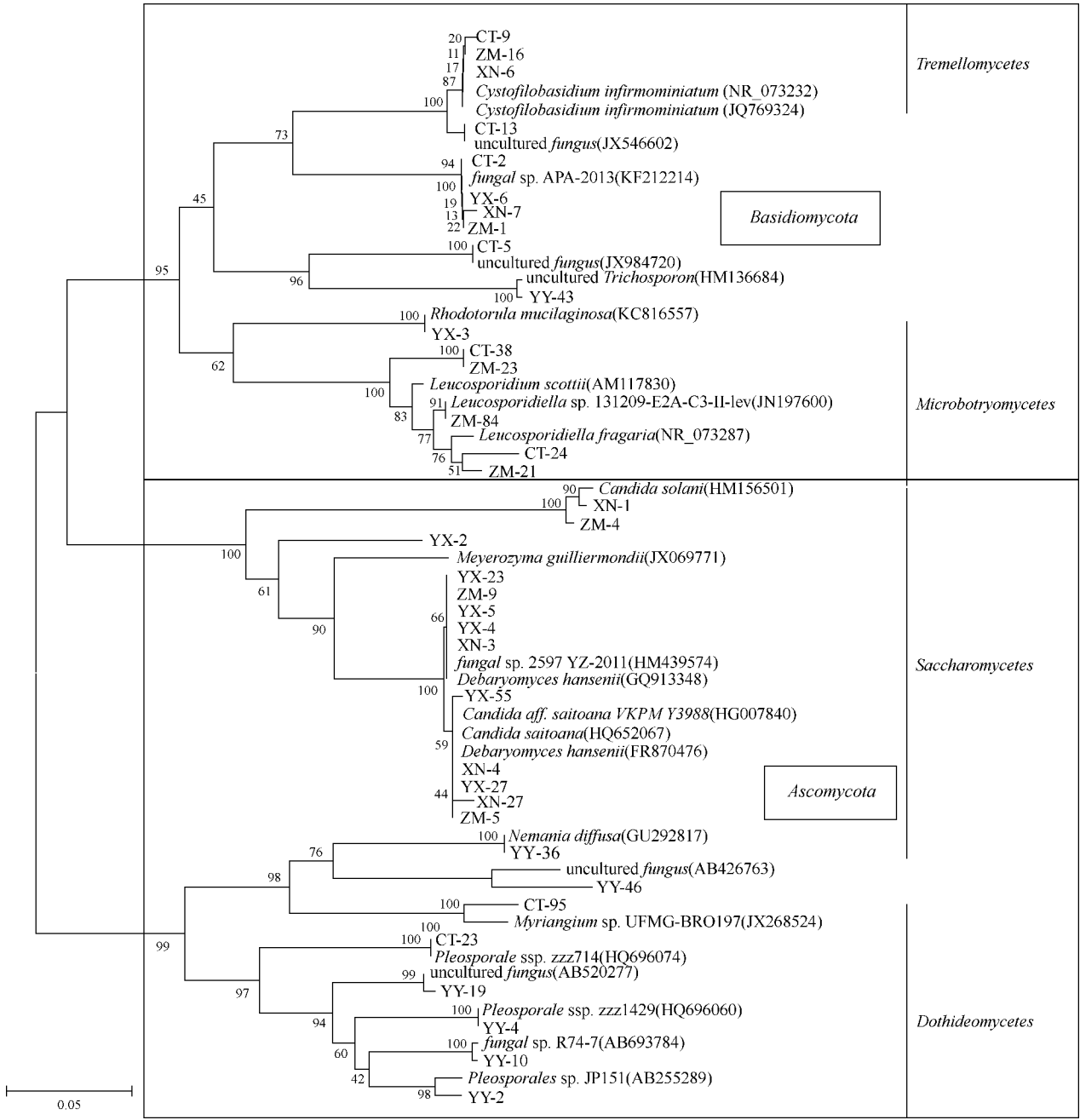


图 4. 与 GenBank 中最高同源性的 ITS 序列构建的进化树 (邻近相接法)

Figure 4. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationship of fungal clone based on partial ITS gene sequences (≈ 600 bp) with ITS reference gene sequences available in GenBank. A bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. The number in the parenthesis indicate theoretical T-RF size of that sequence.

(Bi-Rad) ; EZNA Fungal DNA Miniprep Kit (Omega Bio-tek) ; QIAampDNA stool mini kit (Qiagen) 等一些商业试剂盒,不同样品其提取效果不一^[18-21]。本实验选用 EZNA Fungal DNA Miniprep Kit,并略作改进(将样本在液氮和沸水中反复冻融数次),以提高真菌细胞壁破裂效果,从而提高真菌 DNA 的提取

质量。

对于真菌通用引物的选择,笔者查阅文献得到 20 多条通用引物,选取 5 对常用的引物,如:ITS1 和 ITS4^[12];ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4^[22]; 3 条 18S rDNA 通用引物:(5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3') 和 (5'-CCGATCC

CTAGTCGGCATAG-3')^[23]; (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 和 (5'-GATCCCTAGTCGGCATAGTT-3')^[24]; (5'-GCACTTCATTGTGTGTACTG-3') 和 (5'-GGATGAAACTCGTTGACTTC-3')^[25]。经过试验对比,5 对引物都能扩增出特异性条带和不同程度的非特异性条带,其中 ITS1 和 ITS4 的效果最好。

酶切图谱与酶切位点有关,由于对目的片段的基因序列未知,无法针对性的选取,故根据相关文献^[10-11,26-27]选取 *Hinf* I、*Msp* I、*Nco* I、*Kpn* I、*Xba* I、*Taq* I、*Hha* I、*Hae* III 八种常用限制性内切酶进行预实验,其中 *Nco* I、*Kpn* I、*Xba* I 不能切开目的片段;*Msp* I、*Taq* I 少部分能切开;*Hinf* I 能切开,但切开后的片段大小相近,影响分型;*Hha* I、*Hae* III 效果较好。

经过用 α 多样性测度的相关指标对文库进行多样性的统计分析可知,该样品能够较好的反应亚成体大熊猫肠道真菌的多样性和分布的均匀度,此结果类似于空气中真菌的多样性和均匀度^[28]。另外,本实验预测有 23-67 类真菌,少于大熊猫肠道细菌(137-222)^[29]的预测,说明大熊猫肠道内真菌类群数少于细菌,此与牛、羊等草食动物瘤胃^[30]和人类消化道^[31]都有相似之处。

经过测序比对显示,5 只亚成体大熊猫肠道主要以 *Ascomycota*、*Basidiomycota* 2 个门下 *Saccharomycetes*、*Dothideomycetes*; *Tremellomycetes*、*Microbotryomycetes* 4 个纲的 *Candida*、*Debaryomyces*; *Pleosporales*、*Myriangium*; *Cystofilobasidium*、*Trichosporon*; *Leucosporidium*、*Leucosporidiella* 8 个菌属为主,另外还有一部分未能明确分类地位和不可培养的真菌。此结果与周杰琰等^[32]对亚成体大熊猫运用培养方法鉴定出的真菌所属门类似,所属种类及优势菌存在一定差异,这可能是亚成体大熊猫肠道中真菌很多不能用培养方法培养得到。另外,一些丰度较低、不易被分子生物学方法扩增到的真菌种类由于培养条件适宜而被富集,从而造成两种方法得到的结果有所差异。与牛、羊等反刍动物消化道中所发现的真菌所属门类似,种类存在一定差异^[30],可能是由于其消化道结构不同而引起。与贡嘎蝠蛾幼虫肠道内真菌所属门类似,且都分离到 *Trichosporon* 属^[33]。

本实验运用分子生物学方法研究了亚成体大熊猫肠道真菌的多样性,从而揭示了亚成体大熊猫肠

道存在的优势真菌,在国内外尚属首次。研究发现,反刍动物瘤胃内存在能够消化纤维性食物的真菌^[30],而大熊猫 99% 的食物为竹类植物,大熊猫肠道内真菌的存在是否有助于大熊猫对纤维素的消化值得进一步研究。此外,本课题组目前正采用高通量测序进一步了解大熊猫肠道内真菌的结构以及真菌在大熊猫消化纤维素中扮演的角色。

参考文献

- [1] O'Hara A, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *Embo Reports*, 2006, 7(7): 688-693.
- [2] Ley R, Lozupone C, Hamady M, Knight R, Gordon J. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(10): 776-788.
- [3] Zhou X, He G. Analysis of the mortality factor of the disease in giant panda and protection measures. *Journal of Northeast Forestry University*, 1998, 26(1): 53-56. (in Chinese)
邹兴淮, 何光听. 大熊猫疾病死亡因素分析及其保护对策. 东北林业大学学报, 1998, 26(1): 53-56.
- [4] Pan K, He M. Research and application of microbial additives. *Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives*, 2002, 7(4): 35-37. (in Chinese)
潘康成, 何明清. 我国微生物添加剂研究及应用. 兽药与饲料添加剂, 2002, 7(4): 35-37.
- [5] Hirayama K, Kawamura S, Mitsuoka T, Tashiro K. The faecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Microbiology*, 1989, 67(4): 411-415.
- [6] Huai P, Ma Q, Ren J. Isolation and identification of intestinal flora in giant panda. *Beijing Agriculture*, 2009, 21: 22.
- [7] Wei G, Lu H, Zhou Z, Xie H, Wang A, Nelson K, Zhao L. The microbial community in the feces of the giant panda (*ailuropoda melanoleuca*) as determined by PCR-TGGE profiling and clone library analysis. *Microbial Ecology*, 2007, 54(1): 194-202.
- [8] Hawksworth D, Rossman A. Where are all the undescribed fungi. *Phytopathology*, 1997, 87(9): 888-891.
- [9] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Bmc Microbiology*, 2010, 10(1): 189.
- [10] Diguta C, Vincent B, Guilloux B, Alexandre H,

- Rousseaux S. PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 2011, 28(6): 1145-1154.
- [11] Dickie I, FitzJohn R. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 2007, 17(4): 259-270.
- [12] Kaul S, Kour H, Pandita D, Kour S, Dhar M. Polymerase chain reaction: restriction fragment length polymorphism differentiates the environmental and clinically important fungal isolates. *National Academy Science Letters*, 2013: 1-8.
- [13] Allen B, Kon M, Bar Y. A new phylogenetic diversity measure generalizing the Shannon index and its application to phyllostomid bats. *The American Naturalist*, 2009, 174(2): 236-243.
- [14] Yavitt J, Yashiro E, Cadillo Q, Zinder S. Methanogen diversity and community composition in peatlands of the central to northern Appalachian Mountain region, North America. *Biogeochemistry*, 2012, 109(1-3): 117-131.
- [15] Grünwald N, Goodwin S, Milgroom M, Fry W. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 2003, 93(6): 738-746.
- [16] Salton M. The Bacterial Cell Wall. Berlin: Springer, 1964: 53-59.
- [17] Bartnicki G. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, 1968, 22(1): 87-108.
- [18] Fredricks D, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(10): 5122-5128.
- [19] Wang Q, Wang X. Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis. *Pakistan Journal of Zoology*, 2012, 44: 421-426.
- [20] Guglielmo F, Michelotti S, Nicolotti GG. Population structure analysis provides insights into the infection biology and invasion strategies of *Kretzschmaria deusta* in trees. *Fungal Ecology*, 2012: 55-61.
- [21] Brown E, Allen V. Analysis of the fungal, archaeal and bacteriophage diversity in the human distal gut. *Studies by Undergraduate Researchers at Guelph*, 2011, 4(2): 75-82.
- [22] Peterson R, Bradner J, Roberts T, Nevalainen K. Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(2): 218-225.
- [23] Guo R, Zheng N, Lu H, Yin H, Yao J, Chen Y. Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis. *Microbial Ecology*, 2012, 64(4): 918-927.
- [24] Chen Y, Chen Z, Guo R, Chen N, Lu H, Huang S, Wang J, Li L. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70(4): 492-498.
- [25] Lockhart R, Van D, Beadle I, Humphreys P, McCarthy A. Molecular biological detection of anaerobic gut fungi (Neocallimastigales) from landfill sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5659-5661.
- [26] Rezaei M, Makimura K, De H, Shidfar M, Zaini F, Eshraghian M, Naghan P, Mirhendi H. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Medical Mycology*, 2013, 51(2): 203-207.
- [27] Martinez C, Ramon D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113(2): 147-153.
- [28] Lee S, Lee H, Kim S, Lee H, Kang H, Kim Y. Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by T-RFLP analysis and quantitative real-time PCR. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(6): 1349-1357.
- [29] He T, Cui T, Zhong Z, Wang C, He Y, Wang Y, Zhang H, Li D, Li C, Zhang T. Researching of the diversity of intestinal flora of adult ailuropoda based on 16S rDNA-RFLP. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(11): 1121-1127. (in Chinese)
- 何廷美, 崔婷婷, 钟志军, 王承东, 何永果, 王隼, 张和民, 李德生, 李才武, 张婷婷. 成年大熊猫肠道菌群多样性的 16S rDNA-RFLP 分析. *中国兽医科学*, 2012, 42(11): 1121-1127.
- [30] Kamra D. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 2005, 89(1): 124-135.
- [31] Kuehnbacher T, Ott S, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleessen B, Gionchetti P, Blaut M, Campieri M, Fölsch U. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy in pouchitis. *Gut*, 2006, 55(6): 833-841.
- [32] Zhou J, Liu L, Wang J, Liu C. Identification and Analysis of Culturable Fungi in Spring Feces of Giant

Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in Yunnan Wildlife Park. *Journal of Southwest Forestry University*, 2012, 32 (1): 75-78. (in Chinese)

周杰珑, 刘丽, 王家晶, 刘成会. 春季动物园大熊猫粪便可培养真菌鉴定与分析. *西南林业大学学报*, 2012, 32 (1): 75-78.

[33] Yu H, Wang Z, Liu L, Xia Y, Yin Y, Yuan Q, Cao Y,

Peng G. Analysis of fungal diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (4): 439-445. (in Chinese)

俞和韦, 王中康, 刘莉, 夏玉先, 殷幼平, 袁青, 曹月青, 彭国雄. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性分析. *微生物学报*, 2008, 48 (4): 439-445.

Intestinal fungal diversity of sub-adult giant panda

Shengquan Ai^{1#}, Zhijun Zhong^{1#}, Guangneng Peng^{1*}, Chengdong Wang^{2#}, Yongjiu Luo¹, Tingmei He², Wuyang Gu¹, Caiwu Li², Gangshi Li¹, Honglin Wu², Xuehan Liu¹, Yu Xia¹, Yanhong Liu¹, Xiaoxiao Zhou¹

¹College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, Sichuan Province, China

²Sichuan Ya'an Bifengxia Base, Giant Panda Research Center, Chinese Academy of Forestry Science, Ya'an 625007, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] The fungi diversity in the guts of five sub-adult giant pandas was analyzed. [Method] We analyzed the fungal internal transcribed spacer sequences (ITS) using restriction fragment length polymorphism (RFLP). ITS regions were amplified with fungal universal primers to construct ITS clone libraries. The fingerprints were analyzed by restriction fragment length polymorphism using the Hha I and Hae III enzymes. The cloned PCR products were analyzed by sequencing and diversities were demonstrated by phylogenetic tree. [Results] The gut fungi of 5 sub-adult giant pandas were mainly composed of Ascomycota (average of 46.24%), Basidiomycota (average of 15.79%), unclassified (average of 29.14%), uncultured fungus (average of 8.83%). Ascomycota was mainly composed of Saccharomycetes (average of 63.74%) and Dothideomycetes (average of 35.91%); Basidiomycota was mainly composed of Tremellomycetes (average of 65.80%) and Microbotryomycetes (average of 33.15%). Four classes were mainly composed of *Candida* and *Debaryomyces*; *Pleosporales* and *Myriangium*; *Cystofilobasidium* and *Trichosporon*; *Leucosporidium*, and *Leucosporidiella*, whereas the proportions were different for each sample. [Conclusion] Fungal flora existing in the intestines of sub-adult giant pandas expand our knowledge on the structure of the giant panda gut microbes and also help us to further study whether fungal flora can help giant pandas digest high-fiber foods.

Keywords: giant pandas, ITS sequences, diversity, gut fungi, RFLP analysis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Foundation of China (31272620) and by the Ministry of Education "Changjiang Scholars and Innovative Research Team in planning" Innovation Team Project (IRT0848)

* Corresponding author. Tel: +86-835-2885312; E-mail: pgn.sican@163.com

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 17 February 2014 / Revised: 20 June 2014