

乌梢蛇粪便微生物群组成和特征的种群间差异

李栋梁^① 孙越^② 徐发荣^{①*}

① 北京市动物疫病预防控制中心 北京 102629; ② 北京市畜牧业环境监测站 北京 102200

摘要: 肠道微生物能够协助寄主维持体内稳态、增强营养吸收和能量代谢,对寄主适应环境和维持生存具有重要的意义。本研究以乌梢蛇 (*Ptyas dhumnades*) 桂林 ($n = 3$) 和襄阳 ($n = 3$) 种群的为研究对象,收集动物的粪便提取微生物总 DNA,进行 16S rRNA 基因 V1 ~ V3 区域扩增子测序,分析两个种群乌梢蛇粪便微生物群组成、丰度和基因功能预测上的差异。结果表明,两种群的粪便微生物在 α -多样性上无显著差异,两种群相对丰度较高的粪便微生物和基因功能类型存在显著差异。在门水平上,乌梢蛇粪便微生物群优势门为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和梭杆菌门 (Fusobacteria)。线性判别分析分析显示,桂林和襄阳种群的乌梢蛇粪便微生物具有显著的丰度差异特征。此外,对两种群粪便微生物基因功能预测,在与环境信息处理、代谢相关和遗传信息处理有关的基因均有不同程度的差异。未来需要更多的研究关注野外动物粪便微生物菌种组成及其与寄主的进化关系,为野生动物保护提供粪便微生物方面的相关建议。

关键词: 乌梢蛇; 粪便微生物群; 基因功能预测

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2021) 05-696-11

Differences in Faeces Microbiome Composition and Characteristics Between Two Populations of *Ptyas dhumnades*

LI Dong-Liang^① SUN Yue^② XU Fa-Rong^{①*}

① *Beijing Animal Disease Prevention & Control Center, Beijing 102629;*

② *Beijing Monitoring Station of Animal Husbandry Environment, Beijing 100200, China;*

Abstract: Gut microbiota can help hosts maintain homeostasis, enhance nutrient absorption and energy metabolism, which is of great significance for the survival and environment adaption. Many factors can affect the gut microbiota, including microhabitat, captivity, seasonal changes, feeding items, sex, and development stage. In this study, the Big-eyed Ratsnake (*Ptyas dhumnades*) from Guilin and Xiangyang populations were selected as the research objects. The total microbial DNA was extracted from snake feces to sequence the V1 - V3 regions of 16S rRNA gene using the amplicon sequencing and the differences in gut microbial

* 通讯作者, E-mail: xufr001@sina.com;

第一作者简介 李栋梁, 男, 高级兽医师; 研究方向: 动物疫病防控; E-mail: ldldl@163.com。

收稿日期: 2021-02-05, 修回日期: 2021-05-07 DOI: 10.13859/j.cjz.202105007

composition, abundance, and gene function between the two populations were analyzed. At the phylum level, the dominant phyla included Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes and Fusobacteria (Fig 1). Linear discriminant analysis effect size (LefSe) analysis showed richly distributed bacteria and gene functions were different in the two populations (Fig. 2). However, there was no significant differences in α -diversity between the two populations (Fig. 3). The relatively high bacterial abundance in the Guilin population included the order Cardiobacteriales, the family Wohlfahrtiimonadaceae and the genus *Koukoulia* in Proteobacteria, and the members of the order Acidaminococcales and the genus *Phascolarctobacterium* in Firmicutes. However, the Xiangyang population owned the relatively high proportion in the order Burkholderiales, the family Aquaspirillaceae and the genus *Microvirgula* of Proteobacteria. In addition, the gene functional differences of gut microbiota between two populations were reflected in the high expression related to environmental information processing including ko02010 and ko02060 in Guilin populations. In contrast, those related to the ko02020 and ko00910 were mainly expressed in the Xiangyang population (Fig. 4). The high expression genes were related to the metabolism including ko00010, ko00520, ko00230 and ko00240 in the Guilin population, and ko00680 and ko00900 in the Xiangyang population (Fig. 4). Guilin population expressed highly of ko03018, ko03010 and ko00970, while Xiangyang population expressed highly of ko02030. In the future, more studies are needed to focus on the composition of gut microbiota and the evolutionary relationships between gut microbiota and their hosts to provide relevant suggestions for the protection of wild animals.

Key words: *Ptyas dhumnades*; Faeces microbiome; Gene function prediction

肠道微生物组与寄主的互利关系在包括无脊椎动物、两栖动物、爬行动物、鸟类和兽类中得到了广泛研究。肠道微生物能够编码大于寄主基因组 10~100 倍的独特基因,对寄主的内稳态、营养吸收、生长和发育、行为甚至快速适应都有极其重要的意义。寄主和肠道微生物的协同进化受诸多生态因素的影响,包括寄主的进化地位 (Kartzinel et al. 2019)、食性 (Campos et al. 2018) 以及环境因子季节 (Kartzinel et al. 2019) 和栖息地 (Zhang et al. 2018) 等。因此,肠道微生物组不仅具有寄主特异性,还会受到环境因素的影响,研究肠道微生物组的成因具有重要的生态学意义。

大量的研究表明,肠道微生物的结构和丰度在不同动物类群中存在显著的特异性。厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 是两栖动物 (Kohl et al. 2013)、爬行动物 (Zhang et al. 2018) 和哺乳动物 (Zhao et al. 2018) 的肠道优势菌门; 而厚壁菌门和变形菌门

(Proteobacteria) 则是昆虫、鱼类和鸟类肠道微生物的优势菌门 (Dewar et al. 2014, Li et al. 2014, Ye et al. 2014)。除了动物类群的特异性,肠道微生物组成和特征还会受多种因素的影响,如种群、养殖状况、季节变化与动物的健康状况、食性、性别和发育阶段等。例如,人工饲养的北草蜥 (*Takydromus septentrionalis*) 较野外种群北草蜥肠道微生物群落组成、丰度和功能通路均产生了显著差异,这种差异可能与圈养蜥蜴所经历的环境和摄食的变化有关 (Zhou et al. 2020)。

乌梢蛇 (*Ptyas dhumnades*) 是广泛分布于我国中部和南部的大型无毒蛇类。因乌梢蛇在我国没有人工繁殖成功的案例,因此以乌梢蛇为研究对象可以避免人工养殖对乌梢蛇肠道微生物的影响。本研究以乌梢蛇为研究对象,通过 16S rRNA 测序探索不同种群乌梢蛇肠道微生物的组成、丰度和基因功能。以此研究肠道微生物在不同种群乌梢蛇营养吸收和能量转化

过程中所扮演的重要角色。研究结果将有助于更好地研究乌梢蛇的生物学特征，对乌梢蛇的保护起到积极作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2014年6月于广西桂林和湖北襄阳市农贸市场各获得3条乌梢蛇怀卵母体，桂林和襄阳个体的体长分别为 (124.13 ± 2.25) mm 和 (120.87 ± 1.48) mm，两种群体长无显著差异($t = 0.91$, $df = 4$, $P = 0.41$)。在当地获得样本后立刻将蛇放入酒精擦拭消毒的塑料整理箱中过夜，收集粪便，得到粪便后剥去最外层粪便，将得到的样本迅速使用干冰寄回实验室提取DNA。获取粪便样本后，蛇被立即释放。

1.2 测序方法

使用 Qiagen 粪便 DNA 快速提取试剂盒 (Hilden, Germany) 提取粪便样本基因组 DNA，提取方法按照试剂盒使用说明进行。本研究扩增 16S rRNA 基因的 V1 ~ V3 区，并对 PCR 产物进行焦磷酸测序。测序在罗氏 454 GS FLX+系统 (454 Life Sciences, USA) 中完成，实验过程中使用 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 533R (5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3') 作引物对粪便细菌进行 rDNA 测序，短 PCR 产物利用融合引物 5'-454adapter-mid-CCT ACG GGA GGC AGC AGC-3' (正向) 和 5'-454adapter-mid-CCG TCA ATT CMT TTR AGT-3' (反向) 扩增后测序，引物中 M 和 R 为简并碱基，M 为 A 或 C，R 为 A 或 G，PCR 反应体系为 25 μ l，包括 2.5 μ l 10 \times 反应缓冲液、2 μ l DNA 模板 (20 g/L)、引物各 1 μ l (10 μ mol/L)、0.125 μ l Pyrobest 聚合酶 (Takara) 和 5 μ l 的 dNTP (2.5 μ mol/L)。PCR 反应程序为，94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 27 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。每个样品均使用琼脂糖凝胶在 TAE 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 乙酸钠, 0.5 mmol/L Na₂EDTA, pH

8.0) 检测 PCR 产物和产率。PCR 产物的定量，使用制造商推荐的 PicoGreen dsDNA BR 检测试剂盒进行。最后，根据操作指南，在罗氏 GS-FLX 454 平台对每个样品进行 16S rRNA 的 V1 ~ V3 区域测序。

1.3 统计分析

首先对原始数据进行质控，舍弃低质量序列。要求序列长度在 320 ~ 680 bp 之间，条码序列不超过 25%，连续相同的碱基小于 6，不包含模糊碱基，质控后共获得 83 838 个高质量序列，平均长度为 475 bp，这些数据去除单例序列 (即全部样本中仅有一条序列的数据) 后用于后续分析。

使用 Usearch 7.0 按照 97% 的相似性标准对操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 进行分析 (Edgar 2010)，在聚类过程中去除嵌合体，得到 OTU 具有代表性的序列。为了避免较大的部分样本偏差，将 OTU 丰度信息按照序号最小的样本进行标准化，分析过程中保留了至少 2 个样本中 OTU 数大于 5 个且总数大于 20 个的 OTU 进行进一步分析。之后使用 RDP Classifier 2.2 (Quast et al. 2012) 对获取的 OTU 以 70% 的置信度阈值在 Silva132 数据库中进行分类分析，获得每个 OTU 对应的分类信息。

分析两种群粪便微生物 α -多样性指数时主要包括群落丰富度 (abundance-based coverage estimation, ACE)、香农威纳指数 (Shannon-Weiner index)、香农威纳均匀度 (Shannon-Weiner evenness index) 和覆盖度 (Goods's coverage index) 四项指标。使用 mother 和 R 软件平台 (R development core team 2020) 分别计算 α -多样性指数并作图。获得两种群 α -多样性指数数据后，使用 t 检验比较两种群的 α -多样性指数是否存在差异。

利用基于布雷柯蒂斯 (bray_curti) 距离的主坐标分析 (analysis coordinate principal, PCoA) 检测两个种群粪便微生物群中 OTU 相对丰度的差异，并使用 ANOSIM 对两种群乌梢

蛇的粪便微生物进行相似性检验分析。线性判别分析效应大小 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 检验两种群粪便细菌从门到科的显著丰度差异特征, 并找出有显著差异的组分, 然后用线性判别分析 (linear discriminatory analysis, LDA) 估算各组分对丰度差异效果影响的大小 (Segata et al. 2011)。在本研究中, 只有线性判别分析标准设置为以 10 为底的对数转换值大于等于 4。

使用 Tax4Fun 在京都基因和基因组百科全书数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 搜索蛋白质序列并预测基因功能 (Kanehisa 2019)。然后将这些基因进行分类并分配到相应的 KEGG 通路 (Langille et al. 2013)。根据各通路功能基因的数量评估基因在不同种群中的相对丰度, 利用线性判别分析效应大小和线性判别分析比较不同类群间 KEGG 同源基因 (KEGG Orthology, Ko) 1 ~ 3 水平的 KEGG 基因功能丰度和每个水平的效应, 线性判别分析标准设置为以 10 为底对数转换值大于等于 4。所有值均以平均值 \pm 标准误表示, 在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平下进行统计学分析。

2 结果

2.1 乌梢蛇肠道微生物的组成和特征

从桂林和襄阳两个种群各 3 个个体的粪便中分别获得了乌梢蛇肠道微生物原始序列各 (40 079 \pm 1 084) 条 (11 793 ~ 15 442 条) 和 (49 640 \pm 962) 条 (15 810 ~ 17 591 条)。经质控过滤后, 桂林和襄阳两种群各获得 (37 453 \pm 537) 条 (11 054 ~ 14 313) 和 (46 385 \pm 357) 条 (14 804 ~ 16 030) 高质量序列, 序列平均长

度为 (464 \pm 18) bp (428 ~ 488 bp) 和 (486 \pm 2) bp (482 ~ 489 bp)。这些序列共产生 103 个 OTUs, 包含 5 门 7 纲 19 目 33 科和 50 属, 其中, 属水平上有 14.9% 的物种未定名, 1% 的物种无明确的分类信息。桂林和襄阳种群分别包含了 97 个和 99 个 OTUs。两种群共有 OTUs 达 93 个, 桂林种群独有 4 个 OTU, 襄阳种群独有 6 个 OTUs。

2.2 乌梢蛇肠道微生物的种群间差异

桂林和襄阳乌梢蛇粪便微生物群的 α -多样性指数, 包括群落丰富度、香农威纳指数、香农威纳均匀度和覆盖度均无显著差异 (表 1)。为了便于分析, 仅对相对丰度为不低于 3% 的细菌进行了比较。桂林种群的优势门是拟杆菌门 (38.87% \pm 10.20%)、变形菌门 (32.13% \pm 9.59%)、厚壁菌门 (15.94% \pm 10.93%)、梭杆菌门 (Fusobacteria, 9.85% \pm 6.22%) 和脱硫杆菌门 (Desulfobacterota, 3.20% \pm 2.46%), 襄阳种群的优势门是拟杆菌门 (47.90% \pm 8.98%)、变形菌门 (39.56% \pm 14.89%)、厚壁菌门 (6.66% \pm 2.33%) 和梭杆菌门 (5.87% \pm 5.54%) (图 1a)。从科水平看, 桂林种群的优势科为黄杆菌科 (Flavobacteriaceae, 19.57% \pm 10.72%)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae, 14.90% \pm 8.96%)、Wohlfahrtiimonadaceae (10.90% \pm 6.59%)、梭杆菌科 (Fusobacteriaceae, 9.85% \pm 6.22%)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae, 8.77% \pm 5.94%)、Caloramatoraceae (6.69% \pm 6.16%)、Morganellaceae (4.77% \pm 1.74%)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae, 3.36% \pm 3.35%)、脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae, 3.20% \pm 2.46%) 和韦荣球菌科 (Erysipelotrichaceae, 3.01% \pm

表 1 桂林和襄阳乌梢蛇粪便微生物群的 α -多样性指数

Table 1 The faeces microbial α -diversity of *Ptyas dhumnades* in Guilin and Xiangyang populations

种群 Population	多样性指数 Diversity index			
	群落丰富度 Abundance-based coverage estimation, ACE	香农威纳指数 Shannon-Weiner index	香农威纳均匀度指数 Shannon-Weiner evenness index	覆盖度 Goods's coverage index
桂林 Guilin	77.80 \pm 1.34	2.82 \pm 0.18	0.66 \pm 0.04	0.999 \pm 0.000 2
襄阳 Xiangyang	74.62 \pm 3.90	2.43 \pm 0.22	0.57 \pm 0.04	0.999 \pm 0.000 3

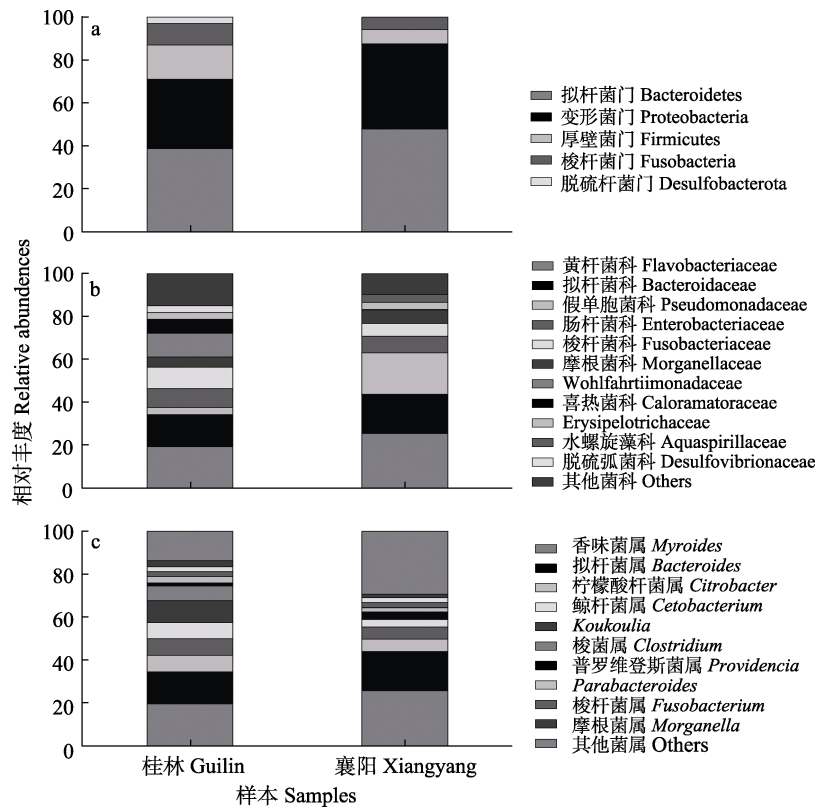


图 1 两种群乌梢蛇粪便微生物群在门 (a)、科 (b) 和属 (c) 水平的相对丰度

Fig. 1 The relative abundance of the gut microbiota in two populations at the phylum (a), family (b), and genus (c) levels

“其他”代表图中各门、科、属分类单元未显示分类单元合并的结果。

The color for ‘others’ indicates all other phyla (a), families (b), or genera (c) combined.

0.94%) (图 1b)。襄阳种群的优势科为黄杆菌科 (25.64% ± 13.61%)、假单胞菌科 (19.22% ± 19.13%)、拟杆菌科 (18.31% ± 15.69%)、肠杆菌科 (7.74% ± 6.39%)、Morganellaceae (6.28% ± 4.29%)、梭杆菌科 (5.87% ± 5.54%)、螺菌科 (Aquaspirillaceae, 3.48% ± 2.97%) 和韦荣球菌科 (3.46% ± 2.23%) (图 1b)。从属的水平上看, 桂林种群的优势属为香味菌属 (*Myroides*, 19.57% ± 10.72%)、拟杆菌属 (*Bacteroides*, 14.90% ± 8.96%)、*Koukoulia* (10.20% ± 6.11%)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*, 7.68% ± 6.20%)、鲸杆菌属 (*Cetobacterium*, 7.56% ± 6.66%)、梭菌属 (*Clostridium*, 6.69% ± 6.16%) 和嗜胆菌属 (*Bilophila*, 3.20% ± 2.46%) (图 1c)。襄

阳种群的优势属为香味菌属 (25.64% ± 13.61%)、拟杆菌属 (18.31% ± 15.69%)、柠檬酸杆菌属 (5.69% ± 4.83%)、鲸杆菌属 (3.51% ± 3.38%)、微枝杆菌属 (*Microvirgula*, 3.48% ± 2.97%) 和普罗维登斯菌属 (*Providencia*, 3.42% ± 2.57%) (图 1c)。

主坐标分析显示, 两种群粪便微生物组成的相似性较高 (图 2, $R = 0.22$, $P = 0.79$), 但两种群微生物相对丰度差异显著。线性判别分析效应大小显示, 两种群的乌梢蛇粪便微生物具有显著的丰度差异特征, LDA 判别显示, 变形菌门的心杆菌目 (Cardiobacteriales)、心杆菌目的 Wohlfahrtiimonadaceae 科和 *Koukoulia* 属以及厚壁菌门氨基酸球菌目 (Acidaminococcales)

和考拉杆菌属 (*Phascolarctobacterium*) 的微生物在桂林种群中更为丰富，而变形菌门伯克霍尔德氏菌目 (*Burkholderiales*)、*Aquaspirillaceae* 科和微枝杆菌属的微生物在襄阳种群中更为丰

富 (图 3)。

2.3 乌梢蛇粪便微生物功能预测

利用 Tax4Fun 分析乌梢蛇两种群粪便样本的 16S RNA，预测两种群乌梢蛇粪便微生物的

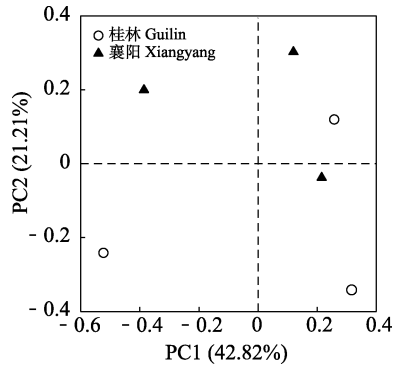


图 2 两种群乌梢蛇粪便微生物群主坐标分析图

Fig. 2 Principal coordinates analysis of Bray-Curtis distance matrix for bacterial diversity differences between two populations of *Ptyas dhumnades*

图中坐标轴的百分数表示不同坐标对总变异的解释力。

The percentages in the figure indicate the explanatory power of different coordinates for the total variation.

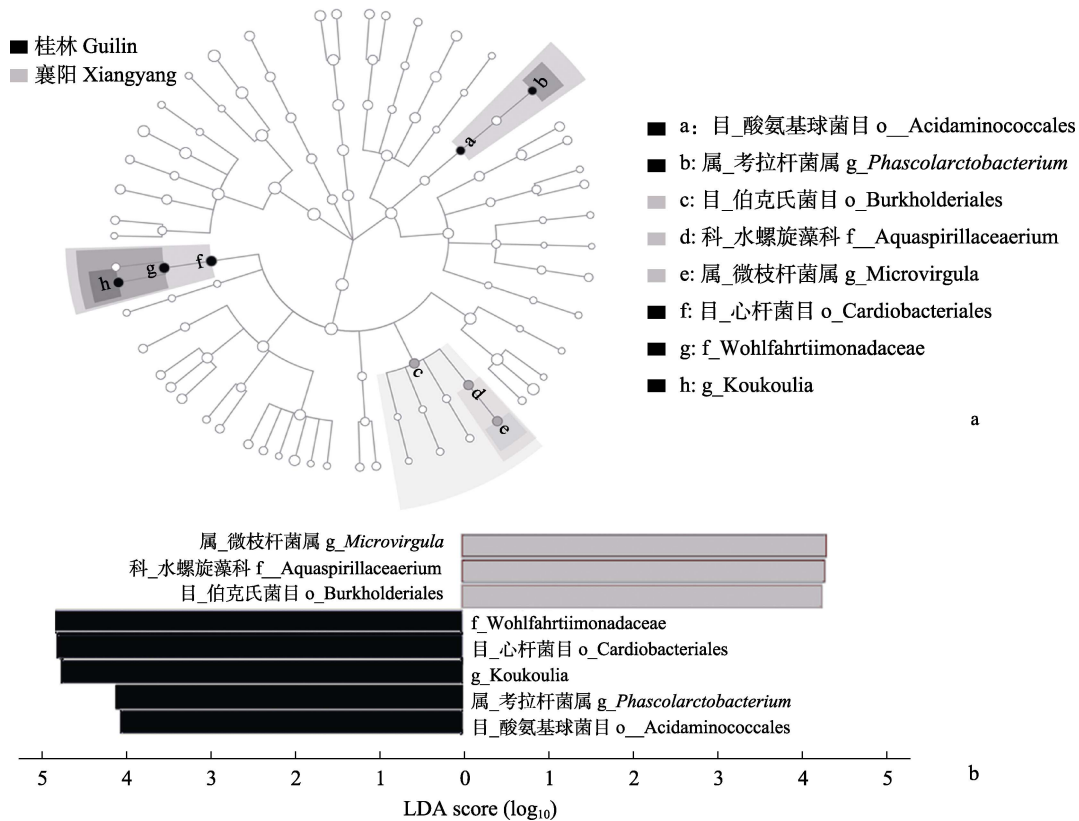


图 3 两种群乌梢蛇粪便微生物群的差异

Fig. 3 Differences in bacterial taxa between two populations of *Ptyas dhumnades*

a. 两种群粪便微生物组的线性判别效应大小分析; b. 线性判别值反应两种群粪便微生物相对丰度存在差异的类群。

a. Differences in bacterial taxa between two populations are determined by linear discriminative analysis of effect size (LEfSe); b. Linear discriminatory analysis (LDA) scores reflect the differences in relative abundance between two populations.

图中字母 p、c、o、f 和 g 分别代表门、纲、目、科和属。

Letters p, c, o, f and g represent phylum, class, order and family, genus, respectively.

基因功能,并将这些基因功能预测到 KEGG 功能分类上的三个水平。两种群第一级基因功能中最具优势的基因功能与代谢相关,桂林和襄阳种群分别占总功能的 $58.39\% \pm 0.36\%$ 和 $56.76\% \pm 1.32\%$;其次与环境信息处理相关,桂林和襄阳种群分别占总功能的 $21.30\% \pm 0.23\%$ 和 $22.79\% \pm 0.64\%$;与遗传信息处理相关基因功能在桂林和襄阳种群分别占总功能的 $11.95\% \pm 0.46\%$ 和 $10.41\% \pm 0.08\%$;与细胞进程相关基因功能在桂林和襄阳种群分别占总功能的 $4.10\% \pm 0.18\%$ 和 $5.26\% \pm 0.35\%$;最后与人类疾病相关基因功能在桂林和襄阳种群分别

占总功能的 $3.24\% \pm 0.08\%$ 和 $3.75\% \pm 0.38\%$ (图 4a)。

基因功能第二层次上有 11 个(相对丰度 $\geq 3\%$)主要基因功能,最丰富的基因功能包括与代谢相关的碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、核苷酸代谢、能量代谢、脂肪代谢、生物降解和代谢七个基因功能在桂林和襄阳种群分别占总功能的 $49.66\% \pm 0.30\%$ 和 $48.17\% \pm 1.13\%$;与环境信息处理相关的膜运输和信号传导两个基因在桂林和襄阳种群分别占总功能的 $21.30\% \pm 0.23\%$ 和 $22.78\% \pm 0.64\%$,几乎占据了该类基因功能第

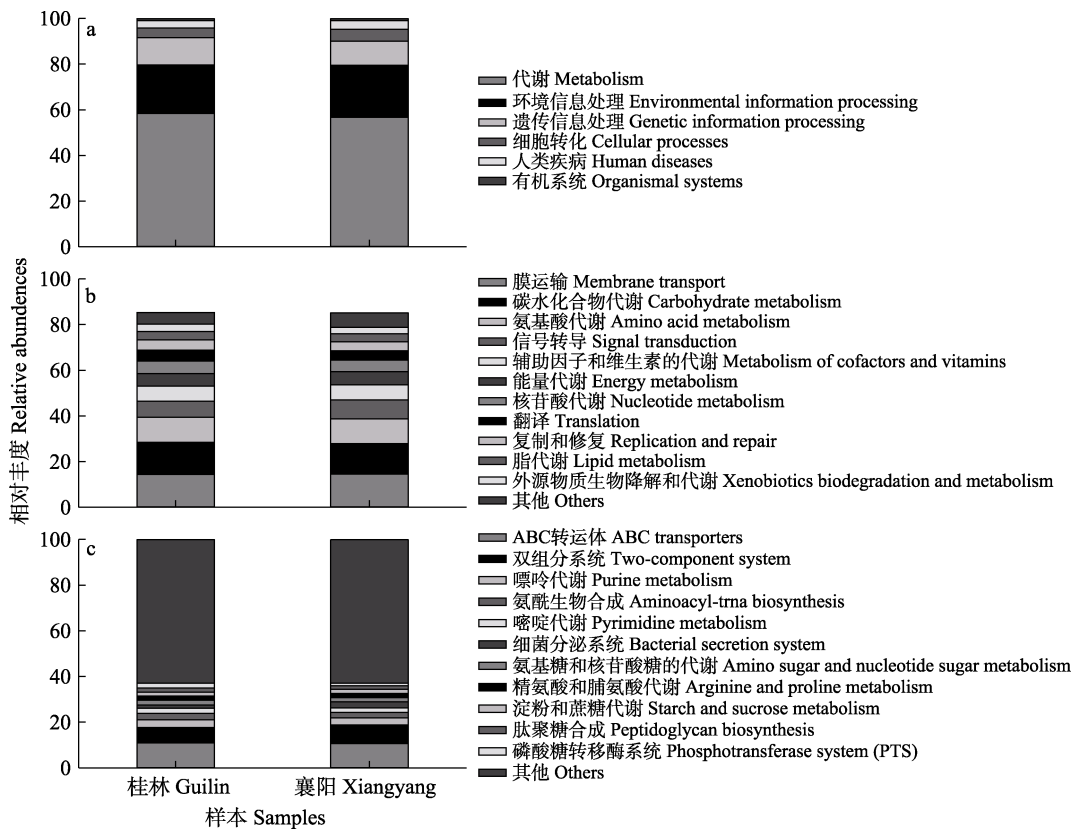


图 4 两种群乌梢蛇粪便微生物群在 KEGG 基因第一层次 (a)、第二层次 (b) 和第三层次 (c) 的相对丰度
Fig. 4 Gene functional categories based on 16S RNA in the gut microbiota at top (a), second (b) and third (c) levels of relative abundance. Linear discriminatory analysis (LDA) scores reflect the differences in relative abundance of gene functional categories between two populations (b)

图 b 和 c 中“其他”代表其余基因功能合并的结果。

The colors for “others” in plots b and c indicate all other gene functions not listed in these two plots.

一层次上的的大部分比例;此外,与遗传信息处理相关的翻译、复制和修复两个基因在桂林和襄阳种群分别占总功能的 $9.22\% \pm 0.42\%$ 和 $7.93\% \pm 0.07\%$ (图 4b)。基因功能第三层次上,两种群共识别 Kos 基因 261 个,相对丰度最高的基因功能涉及 ABC 转运体、双组分系统和嘌呤代谢等 (图 4c)。

基于相对丰度 $\geq 1\%$ 的 Kos 的线性判别分析效应大小显示,两个种群的基因功能上存在明显差异。在基因功能第三个层次上, LDA 判别分析表明,桂林种群粪便微生物具有很高比例的与环境信息处理(ABC 转运体和磷酸转移酶系统)、遗传信息处理(RNA 降解、核糖体和氨酰生物合成)和代谢(糖酵解、氨基糖和核苷酸糖代谢、嘌呤代谢和嘧啶代谢)相关的

基因(图 5)。在襄阳种群中粪便微生物基因功能更多的表现为与细胞进程(细菌趋药性)、环境信息处理(双组分系统)和代谢(甲烷代谢和氮代谢)相关的基因(图 5)。

3 讨论

乌梢蛇粪便微生物群在门水平上以拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和梭杆菌门为主,科水平上以黄杆菌科、拟杆菌科、Wohlfahrtiimonadaceae、梭杆菌科、肠杆菌科、Caloramatoraceae、Morganeliaceae 和假单胞菌科为主,属水平上桂林种群的优势属为香味菌属、拟杆菌属、*Koukoulia*、柠檬酸杆菌属和鲸杆菌属为主。不同动物类群肠道微生物组成具有较大差异,在其他爬行动物中,龟鳖类动物

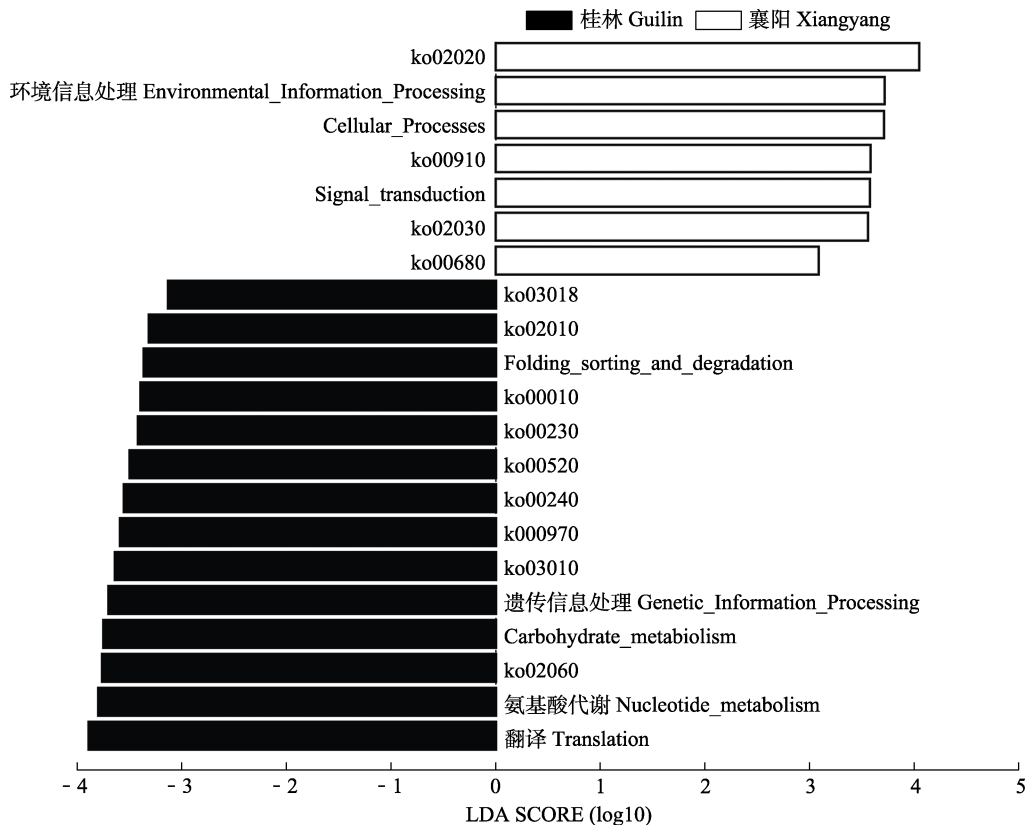


图 5 两种群乌梢蛇粪便微生物群基因功能相对丰度的差异

Fig. 5 Linear discriminatory analysis (LDA) scores reflect the differences in relative abundance of gene functional categories between two populations

肠道微生物的优势门以拟杆菌门和厚壁菌门为主,如地鼠龟(*Gopherus polyphemus*, Yuan et al. 2015)、绿海龟(*Chelonia mydas*, McDermid et al. 2020)、红海龟(*Caretta caretta*, Arizza et al. 2019)、锦龟(*Chrysemys picta*, Fugate et al. 2020)、乌龟(*Chinemys reevesii*, Qu et al. 2020)和红耳滑龟(*Trachemys scripta elegans*, Qu et al. 2020)。在蜥蜴类中,肠道微生物组成在门水平上以厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门为主,如陆鬣蜥属(*Conolophus*, Hong et al. 2011)蜥蜴、海鬣蜥(*Amblyrhynchus cristatus*, Hong et al. 2011)、鳄蜥(*Shinisaurus crocodilurus*, Jiang et al. 2017)、平咽蜥属的 *Liolaemus parvus* 和 *L. ruibali* (Kohl et al. 2017)、瘤尾蜥属的 *Phymaturus williamsi* (Kohl et al. 2017)、安乐蜥(*Anolis cristatellus* 和 *A. sagrei*)和青海沙蜥(*Phrynocephalus vlalangii*) (Zhang et al. 2018)。在蛇类中,大部分动物肠道微生物门水平以变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门为主,如缅甸蟒(*Burmese pythons*, Costello et al. 2010)、百步蛇(*Agkistrodon piscivorus*, Colston et al. 2015)、眼镜蛇(*Naja naja*, Qin et al. 2019)、滑鼠蛇(*Ptyas mucosa*, Qin et al. 2019)、五步蛇(*Deinagkistrodon acutus*, Qin et al. 2019)、红脖颈槽蛇(*Rhabdophis subminiatus*, Tang et al. 2019)和王锦蛇(*Elaphe carinata*, Zhang et al. 2019)等。综上所述,在爬行动物类群中肠道微生物的优势门多为拟杆菌门和厚壁菌门,比较其他脊椎动物类群的肠道优势菌门,说明爬行动物肠道菌群的优势菌门与其进化地位有关。

影响寄主肠道微生物群组成和丰度的因素很多,如食性、栖息地的海拔、纬度和生境以及寄主的生理状况等因素。例如,投喂不同食物的鳄蜥与其野外个体相比较,以泥鳅喂养的个体肠道微生物显著不同于野外个体和以蚯蚓为食的个体,不同的食物类型导致鳄蜥肠道微生物的丰度产生显著变化(Jiang et al. 2017)。在动物园人工饲养环境下,犬科、马科和灵长

类动物会因自由捕食受限、食物多样性下降而降低肠道微生物多样性(McKenzie et al. 2017)。绿海龟肠道微生物多样性会随着年龄的增长而提高(Campos et al. 2018)。本研究发现,乌梢蛇桂林和襄阳种群的肠道微生物 α -多样性无显著差异,但相对丰度具有显著差异,因两种群乌梢蛇均购自农贸市场,缺乏它们的食性和微生境的详细信息,故本研究中获得的结果需要更多的研究来解释其中的原因。

乌梢蛇肠道微生物基因功能主要与代谢、环境信息处理和遗传信息处理有关。这与其他脊椎动物肠道微生物的基因功能相似,在寄主肠道中,微生物主要与能量转化和营养物质吸收有关,如林响尾蛇(*Crotalus horridus*; McLaughlin et al. 2015)、鳄蜥(Tang et al. 2020)和北草蜥(*Takydromus septentrionalis*, Zhou et al. 2020)。在乌龟和红耳滑龟的比较研究中发现,红耳滑龟肠道微生物群较无乌龟更为稳定,具有不易感染疾病和快速增重的特征(Qu et al. 2020)。尽管两种群优势肠道微生物无明显差异,但各自占比较高的肠道微生物和基因功能类型存在显著差异。主要表现为变形菌门(心杆菌目、Wohlfahrtiimonadaceae科和Koukoulia属)和厚壁菌门(氨基酸球菌目和考拉杆菌属)的部分菌种在桂林种群占有较高比例,而襄阳种群肠道微生物中变形菌门的部分菌种(伯克霍尔德氏菌目、Aquaspirillaceae科和微枝杆菌属)具有较高比例。变形菌门有助于提高纤维素酶活性、降解芳香族化合物帮助寄主吸收营养物质(Reid et al. 2011)。而厚壁菌门成员主要负责蛋白质降解和产生多种消化酶切断各种物质,帮助寄主消化和吸收营养(Nelson et al. 2013, Colston et al. 2016)。这些差异可能最终导致了桂林和襄阳乌梢蛇种群肠道微生物基因功能在环境信息处理、遗传信息处理、细胞进程和代谢方面的差异。未来需要更多关注野外动物肠道微生物菌种组成的形成机制和生态学意义,为野生动物保护提供肠道微生物方面的相关建议。

参 考 文 献

- Arizza V, Vecchioni L, Caracappa S, et al. 2019. New insights into the gut microbiome in loggerhead sea turtles *Caretta caretta* stranded on the Mediterranean coast. *PLoS One*, 14(8): e0220329.
- Campos P, Guivernau M, Prenafeta-Boldú F X, et al. 2018. Fast acquisition of a polysaccharide fermenting gut microbiome by juvenile green turtles *Chelonia mydas* after settlement in coastal habitats. *Microbiome*, 6(1): 69.
- Colston T J, Jackson C R. 2016. Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. *Molecular Ecology*, 25(16): 3776–3800.
- Colston T J, Noonan B P, Jackson C R, et al. 2015. Phylogenetic analysis of bacterial communities in different regions of the gastrointestinal tract of *Agkistrodon piscivorus*, the cottonmouth snake. *PLoS One*, 10(6): e0128793.
- Costello E K, Gordon J I, Secor S M, et al. 2010. Postprandial remodeling of the gut microbiota in *Burmese pythons*. *ISME Journal*, 4(11): 1375–1385.
- Dewar M L, Arnould J P Y, Krause L, et al. 2014. Interspecific variations in the faecal microbiota of Procellariiform seabirds. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1): 47–55.
- Edgar R C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19): 2460–2461.
- Fugate H M, Kapfer J M, McLaughlin R W. 2020. Analysis of the microbiota in the fecal material of painted turtles (*Chrysemys picta*). *Current Microbiology*, 77(1): 11–14.
- Hong P Y, Wheeler E, Cann I K O, et al. 2011. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galapagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *ISME Journal*, 5(9): 1461–1470.
- Jiang H Y, Ma J E, Li J, et al. 2017. Diets alter the gut microbiome of crocodile lizards. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2073.
- Kanehisa M. 2019. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science*, 28(11): 1947–1951.
- Kartzinel T R, Hsing J C, Musili P M, et al. 2019. Covariation of diet and gut microbiome in African megafauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(47): 23588–23593.
- Kohl K D, Brun A, Magallanes M, et al. 2017. Gut microbial ecology of lizards: insights into diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions and transmission. *Molecular Ecology*, 26(4): 1175–1189.
- Kohl K D, Cary T L, Karason W H, et al. 2013. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6): 899–903.
- Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9): 814–821.
- Li X M, Zhu Y J, Yan Q Y, et al. 2014. Do the intestinal microbiotas differ between paddlefish (*Polyodon spathala*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) reared in the same pond? *Journal of Applied Microbiology*, 117(5): 1245–1252.
- McDermid K J, Kittle R P, Veillet A, et al. 2020. Identification of gastrointestinal microbiota in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Evolutionary Bioinformatics*, 16: 1176934320914603.
- McKenzie V J, Song S J, Delsuc F, et al. 2017. The effects of captivity on the mammalian gut microbiome. *Integrative Comparative Biology*, 57(4): 690–704.
- McLaughlin R W, Cochran P A, Dowd S E. 2015. Metagenomic analysis of the gut microbiota of the timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Molecular Biology Reports*, 42(7): 1187–1195.
- Nelson T M, Rogers T L, Brown M V. 2013. The gut bacterial community of mammals from marine and terrestrial habitats. *PLoS One*, 8(12): e83655.
- Qin Z, Wang S, Guo D, et al. 2019. Comparative analysis of intestinal bacteria among venom secretion and non-secretion snakes. *Scientific Reports*, 9(1): 6335.
- Qu Y F, Wu Y Q, Zhao Y T, et al. 2020. The invasive red-eared slider turtle is more successful than the native Chinese three-keeled pond turtle: evidence from the gut microbiota. *PeerJ*, 8: e10271.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D590–D596.
- R Development Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing. [CP /OL]. [2020-10-11]. <http://www.R-project.org>.
- Reid N M, Addison S L, Macdonald L J, et al. 2011. Biodiversity of

- active and inactive bacteria in the gut flora of wood-feeding huhu beetle larvae (*Prionoplus reticularis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7000–7006.
- Segata N, Izard J, Waldron L, et al. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6): R60.
- Tang G S, Liang X X, Yang M Y, et al. 2020. Captivity influences gut microbiota in crocodile lizards (*Shinisaurus crocodilurus*). *Frontiers in Microbiology*, 11: 550.
- Tang W, Zhu G, Shi Q, et al. 2019. Characterizing the microbiota in gastrointestinal tract segments of *Rhabdophis subminiatus*: Dynamic changes and functional predictions. *MicrobiologyOpen*, 8(8): e00789.
- Ye L, Amberg J, Chapman D, et al. 2014. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME Journal*, 8(3): 541–551.
- Yuan M L, Dean S H, Longo A V, et al. 2015. Kinship, inbreeding and fine-scale spatial structure influence gut microbiota in a hindgut-fermenting tortoise. *Molecular Ecology*, 24(10): 2521–2536.
- Zhang B, Ren J, Yang D, et al. 2019. Comparative analysis and characterization of the gut microbiota of four farmed snakes from southern China. *Peer J*, 7: e6658.
- Zhang W Y, Li N, Tang X L, et al. 2018. Changes in intestinal microbiota across an altitudinal gradient in the lizard *Phrynocephalus vlangalii*. *Ecology and Evolution*, 8(9): 4695–4703.
- Zhao J S, Yao Y F, Li D Y, et al. 2018. Characterization of the gut microbiota in six geographical populations of Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*), implying an adaptation to high-altitude environment. *Microbial Ecology*, 76: 565–577.
- Zhou J, Zhao Y T, Dai Y Y, et al. 2020. Captivity affects diversity, abundance, and functional pathways of gut microbiota in the northern grass lizard *Takydromus septentrionalis*. *MicrobiologyOpen*, 9(9): e1095.