

斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物的对比分析

郑思思^{①④} 王稳^② 王爱真^③ 孙浩^① 杨芳^① 王雪莲^① 李来兴^{①*}

① 中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室 西宁 810008; ② 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 西宁 810016; ③ 青海大学生态环境工程学院 西宁 810016; ④ 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 肠道微生物通过维持稳态、辅助消化和促进免疫系统发育等方式维护宿主的健康状态。肠道微生物本身则受到宿主的基因、饮食、年龄和环境等因素的影响。然而, 肠道微生物的变化与宿主年龄之间的关系仍有许多未知。本研究分别收集斑头雁 (*Anser indicus*) 2 只成鸟及 3 只雏鸟泄殖腔样品, 提取肠道微生物总 DNA, 采用 16S rRNA 高通量测序的方法, 分析并比较两年龄阶段鸟类肠道微生物的菌群结构及组成差异。研究发现, 斑头雁雏鸟泄殖腔微生物属于 9 个门, 含量最高的前 5 个门分别是梭杆菌门 (48.29%)、厚壁菌门 (22.21%)、变形杆菌门 (22.07%)、放线菌门 (5.02%) 和软壁菌门 (1.93%)。成鸟泄殖腔微生物属于 17 个门, 最多的依次是变形菌门 (64.69%)、厚壁菌门 (23.92%)、蓝细菌 (8.48%)、放线菌门 (1.43%) 和梭杆菌门 (0.56%)。在属的水平, 斑头雁雏鸟泄殖腔微生物属于 18 个属, 而成鸟含有 24 个属。成鸟泄殖腔微生物的 α 多样性显著高于雏鸟 ($P < 0.05$, Welch's *t*-test)。有 186 个操作分类单元 (OTU) 属于成鸟和雏鸟共有, 而其他 640 个 OTU 和 90 个 OTU 则分别隶属于成鸟和雏鸟。雏鸟中 67.39% 的 OTUs 是成鸟所具有的。基于 OTU 的聚类结果与年龄分组一致。本结果对认识鸟类肠道微生物与宿主年龄变化之间的关系有一定的参考价值。

关键词: 斑头雁; 泄殖腔微生物; 微生物组; 高通量测序; 年龄

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 04-641-11

Comparative Analysis of the Cloacal Microbiome of both Adult and Chick Bar-Headed Geese (*Anser indicus*)

ZHENG Si-Si^{①④} WANG Wen^② WANG Ai-Zhen^③ SUN Hao^① YANG Fang^①
WANG Xue-Lian^① LI Lai-Xing^{①*}

① Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; ② State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016; ③ College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016; ④ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Gastrointestinal bacteria contribute to host health by maintaining homeostasis, increasing digestive efficiency, and facilitating the development of the immune system. Host genetics, diets, ages and

基金项目 国家重点基础研究发展计划项目 (No. 2010CB530301);

* 通讯作者, E-mail: lxli@nwipb.cas.cn;

第一作者介绍 郑思思, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: ssmagic@sina.com.

收稿日期: 2017-11-07, 修回日期: 2018-03-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201804015

environments strongly influence the composition of the gut microbiota. However, changes in microbial community structure with host age remain poorly understood. In this study, collected 2 adults and 3 chicks Bar-headed Geese (*Anser indicus*) cloacal samples, extract total DNA samples, and using 16S rRNA high-throughput sequencing, analysis and comparison the difference of composition and flora structure. According to analysis the intestinal microflora of adult and chick of bar-headed geese, to observed the dynamic changes of different age stage of bird intestinal microflora. A total of 9 different bacterial phyla were identified in the cloacal microbiota of chicks (Fig. 1a). The results showed that Fusobacteria predominated (48.29%) among chicks followed by Firmicutes (22.21%), Proteobacteria (22.07%), Actinobacteria (5.02%) and Tenericutes (1.93%) (Table 2). A total of 17 different bacterial phyla were identified in the cloacal microbiota of adults (Fig. 1a). The top 5 most abundant phyla identified were: Proteobacteria (64.69%), Firmicutes (23.92%), Cyanobacteria (8.48%), Actinobacteria (1.43%) and Fusobacteria (0.56%) (Table 2). At the genus level, the sequences from the samples represented 18 and 24 genera in chicks and adults, respectively (Fig. 1b). We employed Chao1 index and observed species curve to estimate the alpha diversity of the chicks and adults cloacal samples. These results suggested that the diversity of the cloacal microbiota of adult bar-headed geese was higher than in chicks. Analyses based on Bray-Curtis distances revealed strong clustering of the samples by age (Fig. 3a). At the OTU level, there were 186 OTUs shared between the samples from adults and chicks, whereas the other 640 OTUs and 90 OTUs, were specific to the adults and chicks, respectively (Fig. 3b). These results indicated that majority of OTUs (67.39%) presented in the chicks were also presented in the adults. The top 25 most abundant OTUs at the genus level shared by both adults and chicks were shown in Fig. 4. This preliminary study would be valuable for future investigations of the sequential changes in gut microbiota composition with age in birds.

Key words: Bar-headed goose, *Anser indicus*; Cloacal microbiota; Microbiome; High-throughput sequencing; Age

在动物中, 微生物不仅存在于宿主的外部组织, 例如皮肤和毛发等部位, 而且也寄生于内部组织, 例如肠道和生殖道等部位 (McFall-Ngai et al. 2013, Colston et al. 2016)。新一代高通量测序技术以及生物信息分析技术的快速发展, 使得研究人员可以更加深入地研究这些部位的微生物以及它们的基因和代谢产物, 统称为微生物组学 (Eisen 2015, Jovel et al. 2016)。这些微生物中, 又以栖息于动物肠道部位的为最多, 数量高达 10^{11} CFU/g (CFU 为菌落形成单位) (Barnes 1972)。因此又将肠道部位的微生物组统称为“肠道微生物组” (Lloyd-Price et al. 2016)。许多研究表明, 肠道微生物在人类以及动物体内许多基本和关键的生理过程中发挥着重要的作用, 例如发育

(Malmuthuge et al. 2015)、免疫平衡 (Ahern et al. 2014)、营养吸收 (Kau et al. 2011)、维生素合成与甾醇类代谢 (O'Mahony et al. 2015), 甚至众多疾病 (肥胖、糖尿病和癌症) (Kinross et al. 2011, Lee et al. 2014)。据此, 许多国家开展了肠道微生物组学的宏大研究计划 (Pylro et al. 2016, Stulberg et al. 2016)。然而, 虽然大多数的研究计划都围绕着人类以及哺乳动物开展, 但是鸟类的肠道微生物研究近几年亦蓬勃发展 (Waite et al. 2015)。

相较于其他脊椎动物的肠道微生物组学研究而言, 对于野生鸟类的肠道微生物研究较少 (Kohl 2012, Waite et al. 2015)。鸟类肠道微生物的研究主要集中于一些人工养殖的经济物种, 如家鸡 (*Gallus gallus*)、火鸡 (*Meleagris*

gallopavo)、家鸭 (*Anas platyrhynchos*) 和鸵鸟 (*Struthio camelus*) (Pan et al. 2014) 等。而野生鸟类由于研究材料 (尤其是粪便) 较难收集, 故研究较少。现有的研究发现, 与脊椎动物类似, 鸟类的肠道微生物主要由 4 个门构成 (Waite et al. 2014a): 厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes)。Ding 等 (2017) 采用新一代高通量宏基因组学测序技术对鸡的胚、雏鸟和雌性成鸟 3 个生长发育时期的肠道微生物区系进行了检测分析。有 65 个属作为“核心菌属”始终贯穿存在于生长发育 3 个时期, 暗示这些菌属同鸡的整个生命过程有重要关联或发挥重要作用。斑头雁成鸟与雏鸟肠道微生物差异如何, 对斑头雁的人工养殖有着指导意义。

斑头雁 (*Anser indicus*) 是亚洲特有的高原雁类, 繁殖于中亚的蒙古和中国的青藏高原, 越冬于西藏的中南部和亚洲南部地区 (Takekawa et al. 2009)。作为青藏高原数量庞大的主要水鸟之一, 出于保护和经济目的, 从 1979 年开始, 人工养殖斑头雁就开始在我国的青海、西藏、甘肃地区进行 (郑作新等 1979, 何志清等 2014)。在人工孵化和养殖的环境中, 刚孵出的雏鸟胃肠道会立即被周围人工环境中的微生物所占据。相比之下, 在野外, 雏鸟的胃肠道会迅速被亲鸟粪便和巢穴环境中的微生物所占据。在许多鸟类中, 雏鸟的肠道微生物处于一个动态变化的过程, 到成年后渐趋稳定 (Waite et al. 2014b)。因此, 阐明野生斑头雁雏鸟的肠道微生物组成与动态变化对人工饲养斑头雁有着非常重要的参考价值, 一是可以进行雏鸟有益菌、有害菌的分析, 从食物来源、环境避免有害菌对雏鸟的侵害; 二是通过分离培养益生菌制成饲料添加剂添加到人工养殖的斑头雁饮食中, 促进斑头雁的生长发育。在之前的研究中 (Wang et al. 2016a), 发现野生斑头雁核心肠道微生物是以厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门为主。且野生斑头雁中,

拟杆菌门种类多样性显著高于人工饲养的斑头雁 (Wang et al. 2016b)。然而, 目前尚不清楚野生斑头雁成鸟与幼鸟肠道微生物之间的联系。

因此, 本研究对比分析了斑头雁成雏鸟之间泄殖腔肠道微生物的异同, 了解野生斑头雁雏鸟的肠道微生物组成及特征。因为野外斑头雁雏鸟排泄的新鲜粪便量少且稀疏未成形, 本研究采用可以部分反映肠道微生物组成的泄殖腔拭子 (Flammer et al. 1988, Xenoulis et al. 2010) 替代粪便样本进行采样, 并进行 16S rRNA V3 ~ V4 区高通量测序。本研究的结果为更深层次了解斑头雁肠道微生物构成随宿主年龄的变化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2016 年 6 月 12 到 14 日, 在青海湖国家级自然保护区鸟岛 (37°01'39.3"N, 99°44'21.8"E, 海拔 3 200 m) 附近的农地设置迷网捕捉斑头雁。为避免捕获的鸟来自同一巢, 每天只在所有捕获的鸟中随机取 1 只斑头雁进行泄殖腔的棉拭子取样, 然后将所有捕获个体释放。共采集 3 只雏鸟 (10 日龄) 和 2 只成鸟的样品。棉拭子样品先储存于 -20 °C 车载冰箱, 然后转移到实验室 -80 °C 冰箱保存。在本研究中, 通过比较野生斑头雁雏鸟与养殖场人工孵化雏鸟的颜色和身体大小来判断雏鸟的日龄。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和 Illumina HiSeq 2500 测序

样品的 DNA 提取采用 E.Z.N.A.® stool DNA 试剂盒 (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA), 并按照操作手册进行。分别采用 NanoPhotometer (Implen, Westlake Village, CA USA) 和 Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 进行纯化以及浓度测定。细菌 16S rRNA 的 V3 ~ V4 区 PCR 扩增引物为 341F (5'- CCT ACG GGN GGC

WGC AG-3') 和 805R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'), 其中, N 表示 ACGT 的任一种, W 表示 A 或 T, H 表示 A、C 或 T, V 表示 A、C 或 G。PCR 反应体系为 20 μ l, 包含 4 μ l 5 \times FastPfu buffer, 2 μ l 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μ l 各引物 (5 mmol/L), 0.4 μ l 的 FastPfu 聚合酶和 10 ng 模板 DNA。扩增反应条件, 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 25 次循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 然后使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化回收。回收产物利用 Illumina HiSeq 2500 平台, 进行双末端 250 bp (PE250) 高通量测序。

高通量测序获得的所有原始数据已上传 NCBI 的 SRA 数据库, 收录和检索编号为 SRP090120。

1.3 数据处理与分析

测序得到的是双端序列数据, 首先根据 Paired-end reads 之间的重叠 (overlap) 关系, 将成对的 reads 拼接 (merge) 成一条序列, 同时对 reads 的质量和 merge 的效果进行质控过滤, 根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分不同的样品, 得到有效序列, 并校正序列方向。barcode 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。

使用 Trimmomatic (version 0.33) (Bolger et al. 2014) 对序列进行修剪和去除接头序列, Trimmomatic 从 5' 端开始以窗口 (Window) 的形式进行滑动, 当窗口的平均碱基质量低于设定阈值, 则从该处进行切除, 窗口大小设置为 4 个碱基, 阈值设置为 15, 最小长度设置为 36 bp。修剪后的序列使用 Flash 软件 (version 1.2.8)

(Magoc et al. 2011) 合并 R1 和 R2 端序列, 参数设置为 [-m 10 -x 0.2 -p 33 -r 300 -f 450 -s 150]。最终获得可用于后续分析的高质量 clean reads。

16S rRNA 的序列分析综合使用软件 UPARSE (usearch version v8.0.1517 ,

<http://drive5.com/uparse/>) (Edgar 2013)、QIIME (version 1.9.1) (Kuczynski et al. 2011) 以及 R (version 3.2.3) 完成。使用 uparse (version 7.0.1090) (http://drive5.com/usearch/manual/uparse_cmds.html) 方法进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类, 序列相似性设为 97%, 得到 OTUs 代表序列。OTU 代表性序列基于 PyNAST (version 1.2.2) (Caporaso et al. 2010) 比对的参考数据库是 Greengenes (version gg_13_8)。采用 RDP classifier (version 2.2) (Wang et al. 2007) 对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行物种组成分析, 置信度阈值设为 0.8 (DeSantis et al. 2006)。使用 FastTree (version 2.1.3) (Price et al. 2010) 构建系统进化树。

使用 mothur (version 1.36) (Schloss et al. 2009) 软件计算 α 多样性指数 (Chao1 和 observed species 指数)。 α 多样性通常用于度量群落生态中物种的丰富度, 是反映物种丰富度和均匀度的综合指标。通过绘制稀释曲线, 统计 OTU 的丰富程度, 对比不同样品的稀释曲线就可以直观显示样品间物种多样性的差异。稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性, 并间接反映样品中物种的丰富程度, 当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量渐进合理, 更多的数据量只会产生少量新的物种 (OTUs)。Chao1 指数为估算样品中所含 OTU 数目的指数, 数值越大代表样本中所含物种越多。Observed species 指数则表示该样品中含有的物种数目, 数值越高表明样品物种丰富度越高。独立样本差异显著性采用 Welch's *t* 检验。*P* 值小于 0.05 被认为是差异显著。所有图片均由 R software (version 3.2.2) 生成。

2 结果

2.1 斑头雁成鸟及雏鸟泄殖腔微生物的组成特征分析

经过质量控制后, 所有样本共计得到 512 818 条有效 reads, 组装成 256 388 条有效序列, 序

列平均长度约为 450 bp。这些组装的序列共产生 916 个不同的 OTUs, 每个样本的 OTU 数目从 46 到 574 不等 (表 1)。

在门的水平, 斑头雁雏鸟泄殖腔微生物隶属 9 个门, 成鸟泄殖腔微生物隶属 17 个门 (图 1a)。斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物物种 (菌种) 数含量最高的前 5 个门, 在斑头雁雏鸟中各门细菌菌种数量差异不显著 ($P > 0.05$), 且在斑头雁成鸟中各门细菌菌种数量亦差异不显著 ($P > 0.05$, 表 2)。

在属的水平, 斑头雁雏鸟含有 18 个属, 而斑头雁成鸟含有 24 个属 (图 1b)。序列无法归类到任何已知属的被列为“其他”, 在各个样本中所占比例从 11.10%到 80.64%。链球菌属

(*Streptococcus*) 和梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 在成鸟和雏鸟中均为优势类群, 其余 4 个优势属在成鸟和雏鸟间均不同 (表 3)。

应用 Chao1 指数稀释曲线与 observed species 稀释曲线计算 α 多样性, 雏鸟的 Chao1 指数稀释曲线与 observed species 稀释曲线均低于成鸟。结果表明, 泄殖腔微生物的 α 多样性斑头雁成鸟显著高于雏鸟 ($P < 0.05$, Welch's *t*-test) (图 2)。

2.2 斑头雁成鸟及雏鸟泄殖腔微生物间的异同

基于 Bray-Curtis 聚类分析, 成鸟和雏鸟的肠道微生物组分别聚在一起 (图 3a)。在 OTUs 的水平, 有 186 个 OTU 属于成鸟和雏鸟共有,

表 1 每个样本从门水平到属水平的操作分类单元数目

Table 1 The number of operational taxonomic units (OTUs) assigned to different taxonomic levels (from phylum to genus) in each sample

样本 Samples	操作分类单元数 The number of operational taxonomic units (OTUs)	分类单元数 Number of taxonomic units					
		门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	
雏鸟 Chick	1	46	7	13	14	13	11
	2	189	9	16	21	21	18
	3	133	7	15	21	21	15
成鸟 Adult	1	574	16	25	25	25	25
	2	509	18	24	24	24	23

雏鸟 1~ 雏鸟 3 分别为 3 只 10 日龄雏鸟个体, 成鸟 1、成鸟 2 分别为 2 只成鸟。

Chick 1 - chick 3 represent 3 chicks of Bar-headed Geese in 10 days and adult 1, adult 1 and 2 represent 2 adult birds of Bar-headed Geese.

表 2 斑头雁雏鸟和成鸟泄殖腔中菌种含量最多的前 5 个门

Table 2 The top 5 most abundant phylum in chick and adult

门 Phylum	含量 Percent (%)		P 值 P value
	雏鸟 Chick ($n = 3$)	成鸟 Adult ($n = 2$)	
梭杆菌门 Fusobacteria	48.29	0.56	0.239
厚壁菌门 Firmicutes	22.21	23.92	0.890
变形菌门 Proteobacteria	22.07	64.69	0.211
放线菌门 Actinobacteria	5.02	1.43	0.125
软壁菌门 Tenericutes	1.93	—	0.454
蓝细菌 Cyanobacteria	—	8.48	0.136

“—” 为该门细菌未检测到; P 值为成鸟与雏鸟两组之间门水平菌含量的显著性比较。

“—” The phylum of bacteria was undetected; P value represent the content of significant comparison of adult and chick bar-headed geese in phylum.

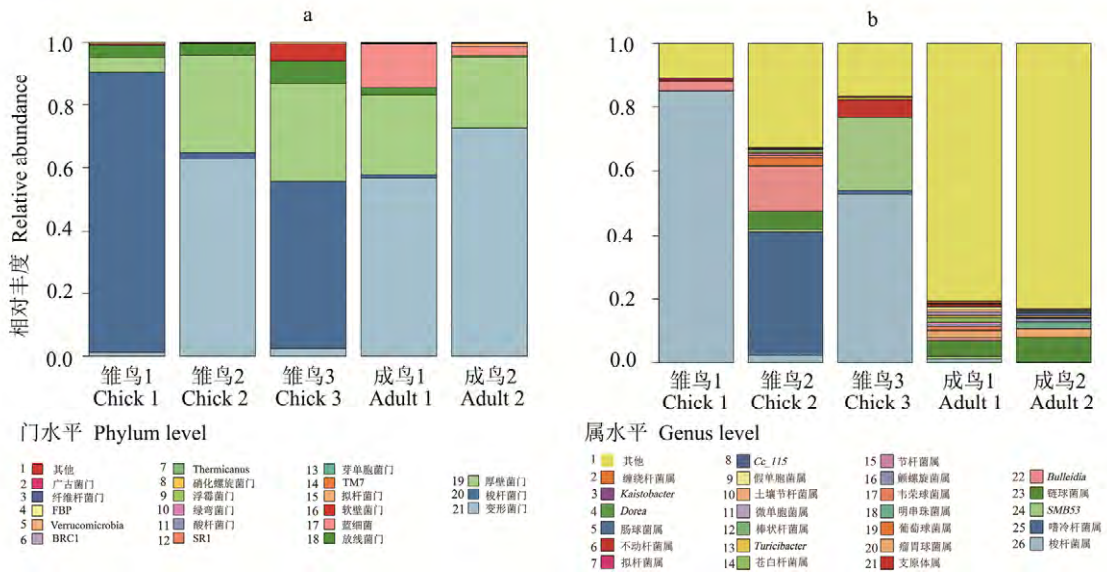


图 1 每个样本在门水平 (a) 和属水平 (b) 的泄殖腔微生物构成

Fig. 1 The microbial compositions of each sample at the level of (a) phylum and (b) genus

a. 斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物在门水平上的构成; b. 斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物在属水平上的构成。

The microbial compositions of each sample at the level of in phylum (a) and in genus (b).

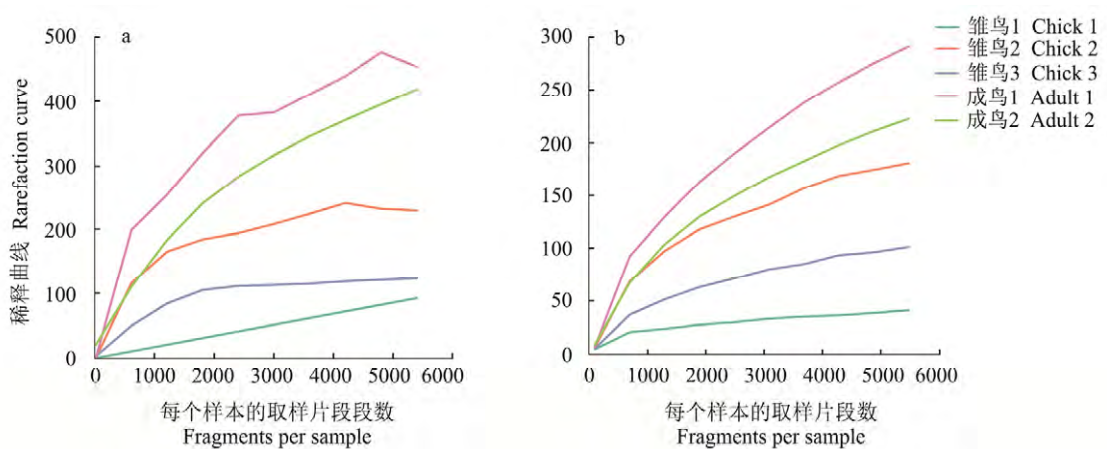


图 2 每个样本 α 多样性的比较

Fig. 2 Comparison of the alpha diversity for each sample

a. Chao1 稀释曲线; b. Observed species 曲线。

a. Chao1 based rarefaction curves; b. Observed species curves comparing the number of reads with the number of phylotypes found in each sample.

成鸟独有 640 个 OTU, 雏鸟独有 90 个(图 3b)。雏鸟的大多数 OTUs (67.39%) 也是成鸟所具有的。成鸟与雏鸟在属水平上共享的丰度最高的 25 个 OTUs 的热图如图 4 所示。

3 讨论

鸟类肠道微生物和其他脊椎动物类似, 处于一个动态变化的过程, 受到很多因素的调控,

表 3 成鸟和雏鸟中含量最多的前 6 个属
Table 3 The top 6 genera in chick and adult

成鸟 Adult			雏鸟 Chick		
门 Phylum	属 Genus	含量 Percent (%)	门 Phylum	属 Genus	含量 Percent (%)
—	其他 Others	20.11	—	其他 Others	81.85
梭杆菌门 Fusobacteria	梭杆菌属 <i>Fusobacterium</i>	46.64	厚壁菌门 Firmicutes	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	6.31
变形菌门 Proteobacteria	嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter</i>	13.39	厚壁菌门 Firmicutes	瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	2.34
厚壁菌门 Firmicutes	<i>Bulleidia</i>	8.33	厚壁菌门 Firmicutes	明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	1.19
厚壁菌门 Firmicutes	<i>SMB53</i>	7.87	厚壁菌门 Firmicutes	颤螺菌属 <i>Oscillospira</i>	0.88
软壁菌门 Tenericutes	支原体 <i>Mycoplasma</i>	1.93	变形菌门 Proteobacteria	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	0.77
厚壁菌门 Firmicutes	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	1.88	梭杆菌门 Fusobacteria	梭杆菌属 <i>Fusobacterium</i>	0.55

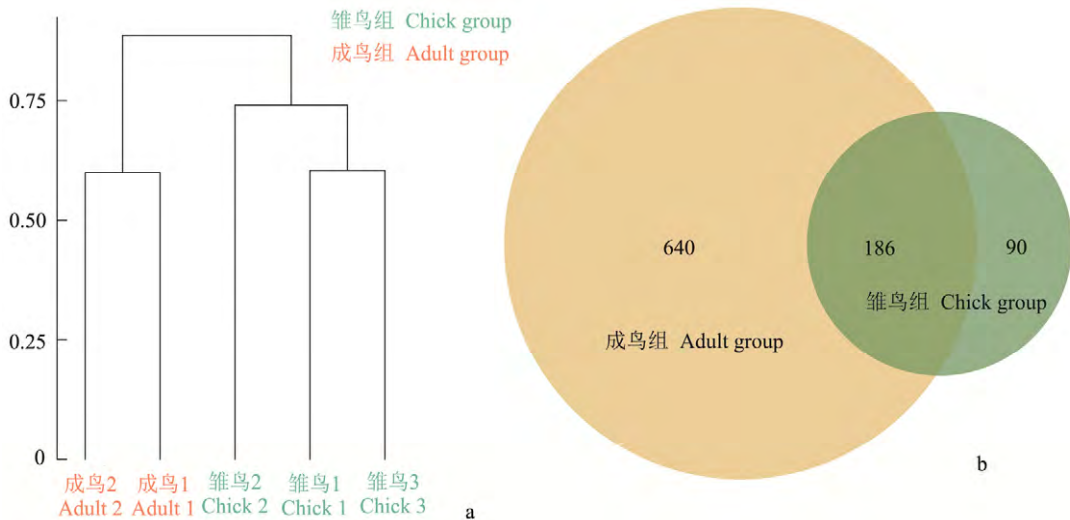


图 3 斑头雁成鸟和雏鸟泄殖腔微生物的异同

Fig. 3 The similarities and differences of cloacal microorganisms of adult and chick Bar-headed Geese

a. 基于 Bray-Curtis 距离的样本归类; b. 韦恩图显示斑头雁成鸟与雏鸟之间重叠和特异的 OTUs。

a. Hierarchical clustering of the samples based on Bray-Curtis distances and; b. Venn diagrams showing the number of overlapping and unique OTUs between adults and chicks.

比如宿主的遗传背景、年龄、饮食和栖息环境等。然而, 各个因素在多大程度上决定鸟类肠道微生物的构成, 仍未明确。在本研究中, 揭示并比较了斑头雁成鸟和雏鸟的泄殖腔微生物,

为研究年龄对鸟类肠道微生物的影响奠定基础。

首先, 研究结果表明, 斑头雁雏鸟的泄殖腔微生物多样性低于斑头雁成鸟。野生三趾鸥

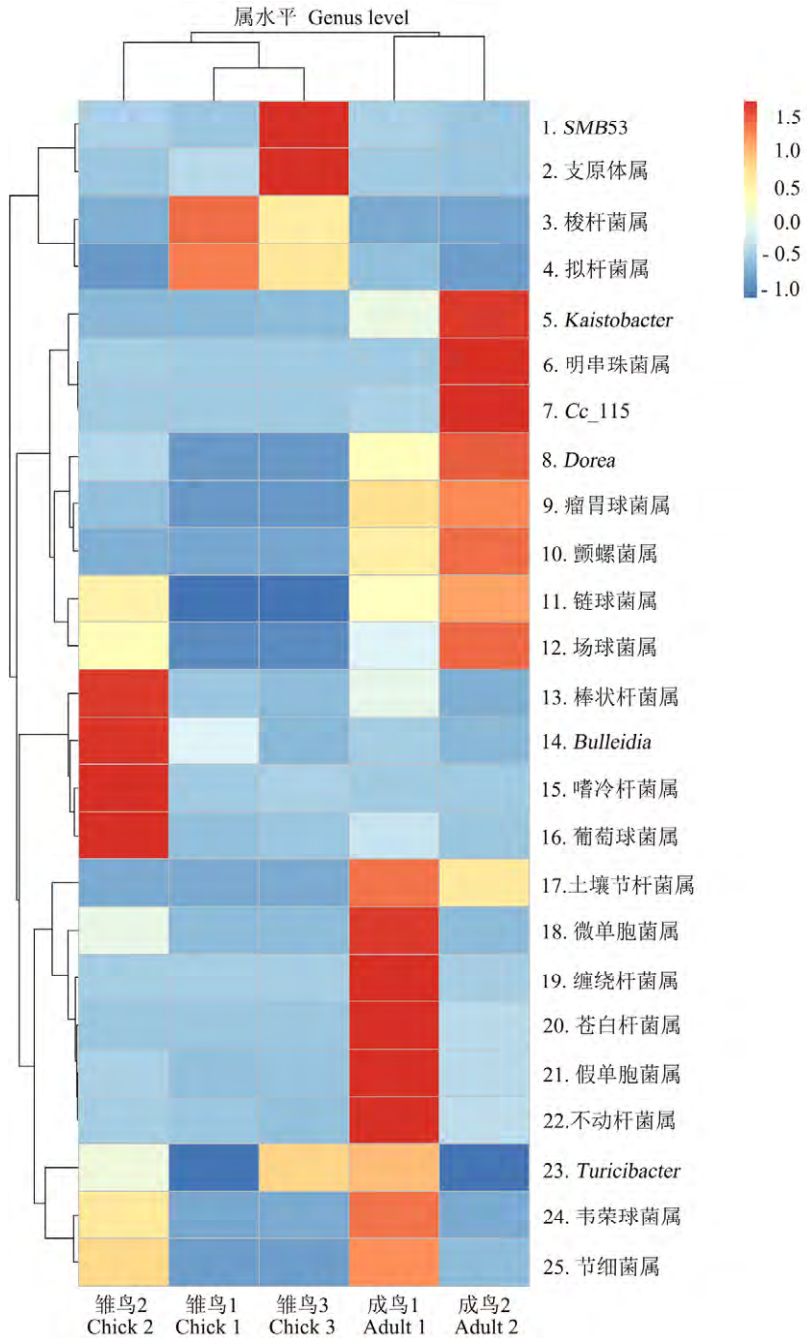


图 4 成鸟与雏鸟在属水平上共享的最丰富的 25 个操作分类单元 (OTU) 的热图

Fig. 4 The heat map of the top 25 most abundant OTUs in genus in each sample

通过聚类, 可以将高丰度和低丰度的分类单元加以区分, 并以颜色梯度及相似程度来反映多个样品在各分类水平上组成的相似性和差异性。红色表示高丰度, 蓝色表示低丰度。

According to cluster, the classification units with high abundance and low abundance can be distinguished, and the similarity and diversity of multiple samples at different classification levels can be reflected by color gradient and similarity. Red indicates high abundance and blue indicates low abundance.

(*Rissa tridactyla*) (van Dongen et al. 2013) 成鸟与雏鸟泄殖腔微生物多样性对比的结果与此一致。也与帽带企鹅 (*Pygoscelis antarcticus*) 泄殖腔微生物的研究结果一致, 即成年企鹅比幼年企鹅泄殖腔微生物具有更高的多样性 (Barbosa et al. 2016)。这种年龄导致的多样性变化可能是由多种原因造成的。首先, 可能是由于雏鸟与成鸟胃肠区的理化性质不同。例如, 初期的肠道, 主要由兼性厌氧菌定植, 随着时间推移, 形成了厌氧环境, 进而为大量专性厌氧菌的定植提供了条件 (Malmuthuge et al. 2015)。而这些菌的大量定植又推动肠道逐渐过渡到一个相对稳定成熟的状态。其次, 雏鸟的活动能力弱, 活动范围有限, 限制了其获得肠道微生物的途径。因此推测, 雏鸟微生物多样性比成鸟低可能与其接触自然环境的能力较低有关。最后, 免疫系统被认为在动物胃肠道菌群的形成中起到关键作用 (Ley et al. 2008)。成年动物相较于幼龄动物, 拥有更趋完善的免疫系统, 可以更多地包容肠道微生物, 辅助其与宿主建立更多的互利共生关系。

本研究中斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物种类或数量也存在差异。比如, 梭杆菌门和放线菌门在雏鸟中含量均高于成鸟。梭杆菌门也被发现同样存在于其他一些鸟类中, 比如阿德利企鹅 (*P. adeliae*) (Dewar et al. 2013)、鹈鹕 (*Dromaius novaehollandiae*) (Bennett et al. 2013) 和秃鹫 (*Aegyptius monachus*) (Roggenbuck et al. 2014)。梭杆菌门菌种可以产生丁酸盐, 进而促进机体的脂肪积累, 增强免疫 (Panda et al. 2009)。据此推测, 斑头雁雏鸟中相对含量较高的梭杆菌门菌种可能有助于增强脂肪积累, 进而提高雏鸟成活率。阿德利企鹅胃肠道菌群中, 含量较高的放线菌门菌种被认为促进食物中几丁质的降解 (Barbosa et al. 2016)。据此推测, 斑头雁雏鸟泄殖腔微生物中放线菌门的丰度较高也可能与食物的消化相关。然而, 斑头雁在早期发育阶段的食物组成几乎是未知的。因此, 在今后的研究中有必要综合考虑斑

头雁雏鸟的饮食结构和微生物群落结构的相关性。而变形菌门和蓝细菌则被发现以较高含量存在于斑头雁的成鸟中。变形菌门作为常见的肠道微生物, 在其他鸟类中也具有很高的含量 (Waite et al. 2015)。作为一种植食性鸟类, 斑头雁食物来源主要是由草, 植物的叶、小枝和种子等构成 (郑作新等 1979)。研究结果中蓝细菌的出现, 可能是来自于食物中植物的叶绿体成分 (胡海汐 2016)。

尽管斑头雁成鸟和雏鸟间泄殖腔微生物组成及含量存在差异, 但在 OTU 水平的韦恩图 (图 3b) 显示, 两者的泄殖腔微生物相似性更多。研究认为, 雏鸟胃肠道菌群的建立过程是高度变化且不稳定的, 期间会有很多过渡性质的微生物出现 (González-Braojos et al. 2012)。例如, van Dongen 等 (2013) 发现, 幼年和成年三趾鸥仅共有 7 个 OTU, 泄殖腔微生物差异十分明显。与此研究结果相反, 本结果显示斑头雁雏鸟和成鸟共享 OTUs 占雏鸟总 OTUs 的比例为 67.39%。原因可能是斑头雁成鸟通过喙对喙的喂食, 传递了部分微生物给雏鸟。另一个原因可能是, 成鸟与雏鸟共享相同的巢环境。本研究结果中斑头雁成鸟和雏鸟共同具有的微生物 (186 个 OTU) 也可能对宿主有益生作用, 因此保留在不同年龄阶段宿主的胃肠道中。

尽管本研究不能提供更长时间尺度的斑头雁雏鸟到成鸟泄殖腔微生物的连续变化, 但本研究初步窥探了成鸟与雏鸟的异同。测序得到的肠道微生物的组成, 可以一定程度上反映斑头雁成鸟和雏鸟间泄殖腔微生物组成及含量存在差异, 表明斑头雁在不同发育阶段对自身肠道微生物组成及含量的调整, 以适应不同的环境变化。当然本研究也有一些局限性, 样本量较小, 且目前还没有科学的方法通过观察来判断野外的成鸟与雏鸟的准确年龄。因此, 对于斑头雁年龄阶段的划分较为模糊, 成鸟与雏鸟的比较, 因缺少幼鸟这一中间阶段的对比数据, 可能导致找到的组间差异较不明显, 不能提供完整的证据证明年龄这一因素对于肠道微生物

组成及含量的影响。因此, 本研究旨在提供一些基本数据对斑头雁成鸟与雏鸟泄殖腔微生物进行对比, 以供参考。最后, 在将来的研究工作中, 在条件允许的情况下, 应在雏鸟的不同发育阶段连续采样, 从而有助于更完善地揭示肠道微生物的变化规律。

参 考 文 献

- Ahern P P, Faith J J, Gordon J I. 2014. Mining the human gut microbiota for effector strains that shape the immune system. *Immunity*, 40(6): 815–823.
- Barbosa A, Balague V, Valera F, et al. 2016. Age-related differences in the gastrointestinal microbiota of chinstrap penguins (*Pygoscelis Antarctica*). *PLoS One*, 11(4): e0153215.
- Barnes E M. 1972. The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12): 1475–1479.
- Bennett D C, Tun H M, Kim J E, et al. 2013. Characterization of cecal microbiota of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Veterinary Microbiology*, 166(1/2): 304–310.
- Bolger A M, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114–2120.
- Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. 2010. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 26(2): 266–267.
- 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.
- DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied & Environmental Microbiology*, 72(7): 5069–5072.
- Dewar M L, Arnould J P, Dann P, et al. 2013. Interspecific variations in the gastrointestinal microbiota in penguins. *Microbiology Open*, 2(1): 195–204.
- Ding J, Dai R, Yang L, et al. 2017. Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens. *Front Microbiol*, 8: Article 1967.
- Edgar R C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10): 996–998.
- Eisen J. 2015. What does the term microbiome mean? And where did it come from? A bit of a surprise. *Winnower*, 2: e142971–16196.
- Flammer K, Drewes L A. 1988. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. *Avian Diseases*, 32(1): 79–83.
- González-Braojos S, Vela A I, Ruiz-De-Castañeda R, et al. 2012. Age-related changes in abundance of enterococci and Enterobacteriaceae, in Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings and their association with growth. *Journal of Ornithology*, 153(1): 181–188.
- Jovel J, Patterson J, Wang W, et al. 2016. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7: article 459.
- Kau A L, Ahern P P, Griffin N W, et al. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351): 327–336.
- Kinross J M, Darzi A W, Nicholson J K. 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine*, 3(3): 14.
- Kohl K D. 2012. Diversity and function of the avian gut microbiota. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic & Environmental Physiology*, 182(5): 591–602.
- Kuczynski J, Stombaugh J, Walters W A, et al. 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 1 Unit 1E 5.
- Lee W J, Hase K. 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6): 416–424.
- Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883): 1647–1651.
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(1): 51.
- Magoc T, Salzberg S L. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957–2963.
- Malmuthuge N, Griebel P J, Guan L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Frontiers in Veterinary Science*,

- 2(4814): 459–460.
- McFall-Ngai M, Hadfield M G, Bosch T C, et al. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9): 3229–3236.
- O'Mahony S M, Clarke G, Borre Y E, et al. 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277: 32–48.
- Pan D, Yu Z. 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1): 108–119.
- Panda A K, Rao S V R, Raju M V L N, et al. 2009. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(7): 1026–1031.
- Price M N, Dehal P S, Arkin A P. 2010. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5(5): e9490.
- Pylro V S, Mui T S, Rodrigues J L, et al. 2016. A step forward to empower global microbiome research through local leadership. *Trends in Microbiology*, 24(10): 767–771.
- Roggenbuck M, Bærholm S I, Blom N, et al. 2014. The microbiome of New World vultures. *Nature Communications*, 5: 5498.
- Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied & Environmental Microbiology*, 75(23): 7537–7541.
- Stulberg E, Fravel D, Proctor L M, et al. 2016. An assessment of US microbiome research. *Nature Microbiology*, 1(1): 15015.
- Takekawa J Y, Heath S R, Douglas D C, et al. 2009. Geographic variation in Bar-headed Geese *Anser indicus*: Connectivity of wintering areas and breeding grounds across a broad front. *Wildfowl*, 59(2009): 100–123.
- van Dongen W F, White J, Brandl H B, et al. 2013. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology*, 13(1): 1–12.
- Waite D W, Eason D K, Taylor M W. 2014b. Influence of hand rearing and bird age on the fecal microbiota of the critically endangered kakapo. *Applied & Environmental Microbiology*, 80(15): 4650–4658.
- Waite D W, Taylor M W. 2014a. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, 5(24): 223.
- Waite D W, Taylor M W. 2015. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 6: 673.
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied & Environmental Microbiology*, 73(16): 5261–5267.
- Wang W, Cao J, Li J R, et al. 2016b. Comparative analysis of the gastrointestinal microbial communities of bar-headed goose (*Anser indicus*) in different breeding patterns by high-throughput sequencing. *Microbiological Research*, 182: 59–67.
- Wang W, Cao J, Yang F, et al. 2016a. High-throughput sequencing reveals the core gut microbiome of Bar-headed goose (*Anser indicus*) in different wintering areas in Tibet. *Microbiology Open*, 5(2): 287–295.
- Xenoulis P G, Gray P L, Brightsmith D, et al. 2010. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary Microbiology*, 146(3/4): 320–325.
- 胡海汐. 2016. 蓝细菌异形胞发育关键转录因子 HetR 的结构和失活机制研究. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文.
- 何志清, 张万福, 李岩, 等. 2014. 斑头雁在甘肃濒危动物保护中心的人工饲养. *畜牧与饲料科学*, (2): 34–35.
- 郑作新. 1979. 中国动物志: 鸟纲 第二卷 雁形目. 北京: 科学出版社, 39–43.