

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0324

谭春桃, 李欢, 曲家鹏. 野生和室内饲养高原鼠兔肠道菌群多样性的比较. 草业科学, 2019, 36(2): 531-539.

TAN C T, LI H, QU J P. Comparison of gut microbial diversity between wild and laboratory-reared plateau pika (*Ochotona curzoniae*). Pratacultural Science, 2019, 36(2): 531-539.



野生和室内饲养高原鼠兔 肠道菌群多样性的比较

谭春桃^{1,2}, 李欢³, 曲家鹏^{1,4}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 兰州大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000; 4. 青海省动物生态基因组学重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: 肠道微生物在宿主的生理活动、免疫调节以及健康方面均有重要的作用。尽管已有报道表明高原鼠兔肠道菌群和食物、环境有关, 但对于野生和室内饲养条件下, 取食不同食物的高原鼠兔肠道菌群是否存在差异尚不清楚。本研究利用 16S rRNA 基因高通量测序技术比较夏季野生和室内饲养高原鼠兔的肠道菌群发现, 与野生鼠兔相比, 室内鼠兔有更高丰度的拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和螺旋体门 (Spirochetes), 更低丰度的变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria)。野生和室内饲养的鼠兔肠道共有的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 有 50.1% 是重叠的, 而 49.9% 的 OTUs 是各自特有的。野生和室内饲养肠道菌群的组成和群落结构 (β 多样性) 有显著性差异。因此, 室内饲养鼠兔不能有效反映野生状态下高原鼠兔肠道菌群的情况。

关键词: 高原鼠兔; 微生物; 16S rRNA; 高通量测序; 操作分类单元; 群落结构; 青藏高原

中图分类号: Q938 文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2019)02-0531-09

Comparison of gut microbial diversity between wild and laboratory-reared plateau pika (*Ochotona curzoniae*)

TAN Chuntao^{1,2}, LI Huan³, QU Jiapeng^{1,4}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008, Qinghai, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China;

4. Qinghai Province Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Xining 810008, Qinghai, China)

Abstract: Gut microbiota play important roles in host physiological activity, immune regulation, and health. Although numerous studies have found that gut microbiota of plateau pikas are related to food and environment, the differences of gut microbiota between wild and laboratory-reared plateau pikas are still unclear. In this study, we used 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology to compare the differences of gut microbial communities between wild and laboratory-reared plateau pikas. Our results suggested that laboratory-reared plateau pikas had higher abundance of Bacteroidetes and Spirochetes, but lower abundance of Proteobacteria and Actinobacteria than wild plateau pikas. There was 50.1% overlap of gut operational taxonomic units (OTUs) between wild and laboratory-reared plateau pikas, while 49.9% of gut OTUs were specific in the wild and laboratory-reared plateau pikas. Significant differences were detected in both composition and

收稿日期: 2018-05-23 接受日期: 2018-10-10

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA2002030302); 国家自然科学基金 (31770459); 中国科学院青年创新促进会项目和青海省自然科学基金 (2017-ZJ-761); 青海省重点研发与转化计划项目 (2019-SF-152); 青海省重点实验室建设专项 (2017-ZJ-Y23)

第一作者: 谭春桃 (1993-), 女 (土家族), 湖南龙山人, 在读硕士生, 研究方向为种群生态学。E-mail: tanchuntao16@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 曲家鹏 (1983-), 男, 山东济南人, 副研究员, 博士, 研究方向为草地鼠害防治和动物生态学。E-mail: jpqu@nwpb.cas.cn

共同通信作者: 李欢 (1989-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 博士, 研究方向为肠道微生物生态学。E-mail: lihuan@lzu.edu.cn

<http://cykx.lzu.edu.cn>

community structure (β diversity) of gut microbes in the wild and laboratory-reared plateau pikas. Therefore, laboratory-reared plateau pika could not effectively reflect the gut microbiota of plateau pika in the wild.

Keywords: plateau pika; microbiota; 16S rRNA; high-throughput sequencing; operational taxonomic units; community structure; Tibetan Plateau

Corresponding author: QU Jiapeng E-mail: jpqu@nwipb.cas.cn

LI Huan E-mail: lihuan@lzu.edu.cn

肠道微生物在宿主的消化吸收、能量代谢、免疫调节以及生理健康等方面均有重要的作用^[1-4],且易受食物的影响^[5-8]。肠道微生物通过提高宿主对高纤维、低蛋白植物的消化吸收能力,增强食物利用率和对极端环境的耐受性,维持食物匮乏时动物的正常生理活动^[9-11]。肠道微生物还可以激发动物的细胞与体液免疫,增强动物的免疫力,降低疾病发生概率,维持宿主的生理健康^[12-15]。某些植物对食草动物的取食具有一定的防御作用,会形成次生化合物,而动物的肠道微生物有助于动物降解次生化合物,获取食物资源,提高动物的存活率^[16-17]。尽管有关肠道微生物在人、模式动物和低海拔地区分布动物的研究较多^[18-20],但有关高海拔地区动物肠道微生物的研究甚少。高海拔地区分布的动物面临低温、低氧的极端环境,其肠道微生物可能具有更加复杂的多样性和功能^[21-22]。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是小型植食性哺乳动物,广泛分布于青藏高原海拔 3 200~5 300 m 的高海拔地区^[23]。夏季野生高原鼠兔的食物来源丰富,以摄食垂穗披碱草 (*Elymus nutans*)、黄花棘豆 (*Oxytropis ochrocephala*) 和早熟禾 (*Poa annua*) 等植物为主^[24-25]。而室内饲养高原鼠兔的食物主要由粗蛋白、粗纤维、粗脂肪等组成,具高能量、高蛋白、低纤维等特点。除此之外,高原鼠兔是青藏高原的特有种和关键种,维持着青藏高原生态系统的稳定性^[26-27]。

随着第二代高通量测序技术的发展,已有研究表明食物成分对高原鼠兔肠道微生物的组成和多样性有显著影响,个体的食物成分越相似,其肠道微生物组成与多样性越相似^[28]。高原鼠兔肠道微生物的组成和多样性与种群密度有关,种群密度越高,个体间肠道微生物的相似度越高^[29]。高原鼠兔的肠道微生物与环境微生物组成差异显著,表明肠道微生物受环境影响小,且具有宿主选择专一性^[30]。尽管有关高原鼠兔肠道微生物的研究已有

一系列的进展,然而对于夏季野生和室内饲养高原鼠兔肠道微生物的差异尚不清楚。

为了更好地控制试验变量,往往需要将野生动物带回实验室进行比较^[31],已有研究表明野生和室内饲养状态下动物的肠道菌群有显著差异^[32-33]。本研究基于 16S rRNA 基因高通量测序技术,研究夏季野生和室内饲养高原鼠兔肠道微生物的差异,探讨室内饲养条件下高原鼠兔是否会保留野生鼠兔的肠道菌群,以及保留了多比例的菌群,为以后是否能在室内饲养条件下研究野生小哺乳动物的肠道菌群提供依据。

1 材料和方法

1.1 样品收集

2014 年 6 月,在青海省果洛藏族自治州玛沁县 (100°21' E, 34°24' N, 3 846 m) 采用绳套法捕捉 6 只健康成年高原鼠兔带回实验室。将鼠兔置于鼠笼 (聚丙烯材质, 310 mm×230 mm×160 mm) 中单笼饲养,提供足够的兔颗粒维持饲料 (北京科澳协力饲料有限公司) 和纯净水。8 月 10-12 日 08:00-10:00, 使用 75% 乙醇擦拭灭菌过的眼科镊收集新鲜粪便样品置入无菌管中,快速转移到 -80 °C 超低温冰箱内保存。8 月 14-16 日 08:00-10:00, 在玛沁县相同的野外样地,使用绳套法捕捉高原鼠兔,置于 75% 乙醇消毒后的鼠笼中,使用灭菌后的眼科镊收集新鲜粪便样品置入无菌管中,并迅速置于液氮罐中,随后转移到 -80 °C 超低温冰箱内保存。本研究共收集了室内鼠兔粪便样本 6 份 (雌性 4 份, 雄性 2 份), 野外鼠兔粪便样本 6 份 (雌性 1 份, 雄性 5 份)。

1.2 食物组成

2014 年 8 月 16 日 14:00-18:00 在样地随机选择 10 个 25 cm×25 cm 的样方,刈割植物的地上部分并区分高原鼠兔喜食的物种,混匀后称量植物

鲜重，然后带回实验室在 75 °C 的恒温箱中烘干至恒重并称量计算植物中的水分含量，然后测定干物质的营养成分，无氮浸出物成分复杂，主要成分有淀粉、单糖、有机酸和糊精等。无氮浸出

物的含量等于干物质含量减去粗蛋白、粗脂肪、粗纤维和粗灰分的含量。野外高原鼠兔喜食植物及营养成分和室内饲料原料及营养成分如表 1 所列。

表 1 野生和室内饲养高原鼠兔食物原料及营养成分
Table 1 Food material and nutrition contents of wild and laboratory-reared plateau pikas

食物原料 Food material	营养成分 Nutrition contents	平均含量 Average content/%
野生食物 Wild food		
矮嵩草 <i>Kobresia humilis</i> ,	水分 Water	59.36
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i> ,	粗蛋白 Crude protein	6.06
早熟禾 <i>Poa annua</i> ,	粗脂肪 Crude fat	1.32
鹅绒委陵菜 <i>Potentilla anserina</i> ,	粗纤维 Crude fiber	17.39
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i> ,	粗灰分 Crude ash	3.45
黄花棘豆 <i>Oxytropis ochrocephala</i> ,	无氮浸出物 Nitrogen-free extract	12.42
蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i> ,		
小嵩草 <i>Kobresia pygmaea</i>		
室内食物 Indoor food		
	水分 Water	7.80
玉米 <i>Zea mays</i> ,	粗蛋白 Crude protein	16.60
豆粕 Soybean meal	粗脂肪 Crude fat	3.10
苜蓿粉 Lucerne meal,	粗纤维 Crude fiber	11.20
食盐 Salt,	粗灰分 Crude ash	8.50
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate,	无氮浸出物 Nitrogen-free extract	52.80
石粉 Mountain flour		

1.3 16S rRNA 测序和生物信息学分析

采用生工 Ezup 柱式土壤 DNA 抽提试剂盒提取肠道内容物的总 DNA。用可见分光光度计对 DNA 进行集中纯化。提取的 DNA 用 10 ng·μL⁻¹ 的稀释液用来做 PCR 扩增。用通用引物 515F(5-GTGY CAGCMGCCGCGGTA-3), 909R(5-CCCCGYCAATT-CMTTTRAGT-3) 和 12 nt 独特的条形码在 515F 的 5' 末端扩增微生物的 16S rRNA 的 V4-V5 区域^[34]。PCR 扩增用含有 1 × PCR 缓冲液的 25 μL 反应混合物、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 和 0.2 mmol·L⁻¹ 的脱氧核苷三磷酸加 1.0 μmol·L⁻¹ 的引物和 0.25 U 的 Ex Taq, 最后加入 10 ng 基因组 DNA。为了减少 PCR 偏倚, 每个样品做 2 个 PCR 平行。在 PCR 仪上于 94~96 °C 预加热几十秒至几分钟, 使模板 DNA 充分变性, 然后进入扩增循环。先于 94 °C 中保持 3 min 使模板变性, 然后依次保持 94 °C 的 40 s、56 °C 的 60 s、72 °C 的 60 s, 如此做 30 个循环, 最后在 72 °C 中保留 10 min 使产物延伸完整。最后将纯化的 PCR

产物汇集在相同浓度使用 Illumina Miseq 测序仪进行测序^[35]。

原始序列数据使用 QIIME1.7.0 处理 (<http://qiime.org/tutorials/tutorial.html>)。所有序列都被修剪并根据条形码分离每个样本(条形码错误碱基 = 0)。使用 Flash-1.2.8 软件根据双末端序列重叠的区域进行拼接^[36]。获得的双末端序列进行过滤(保留那些读取长度 > 300 bp, 无模糊序列 N, 平均序列质量分数 > 30 的序列)作进一步分析。由于在 PCR 扩增叶绿体序列可能污染, 采用 Metaxa2 软件工具从大量的测序数据删除叶绿体序列^[37]。对齐的 16S rRNA 基因序列被用于使用 Uchime 算法进行嵌合体检查^[38]。所有的序列使用 CD-HIT 以 97% 的相似度聚类为操作分类单元(OTU), 过滤只有 1 条序列的 OTU^[39]。为了比较不同测序深度的样本, 每个样本的序列统一为 5 070 个序列。计算 α 多样性指数, 包括 PD_whole_tree, Chao1, Shannon, Observed-species, Goodscovrage, Simpson, Equitability 等多样性指数, 通

过 QIIME 处理计算 weighted UniFrac 和 unweighted UniFrac 距离矩阵^[40]。

原始序列数据可在欧洲核苷酸数据库中获得, 数据编号及网址为 PRJEB26642 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/datd/view/PRJEB26642>)。

1.4 统计分析

前期研究已表明, 性别对高原鼠兔肠道微生物无显著影响^[28-29], 故本研究没有分析性别对高原鼠兔肠道微生物的影响。采用单因素方差分析, 比较室内与野生高原鼠兔肠道微生物的 α 多样性与组成的差异。基于 OTUs 使用 Venny 2.1.0 做维恩图, 分析两组鼠兔肠道微生物的差异大小。使用 *vegan* package 对 weighted UniFrac 和 unweighted UniFrac 距离矩阵分别进行 PCoA 分析来比较两组鼠兔肠道微生物群落结构 (β 多样性) 的差异。除维恩图外, 其余统计分析均在 R 3.2.5 上实现。

2 结果

2.1 肠道微生物组成

在门的水平上, 野生高原鼠兔肠道微生物主要由拟杆菌门 (Bacteroidetes)(43.06% \pm 5.52%)、变形菌门 (Proteobacteria)(24.84% \pm 5.70%)、厚壁菌门 (Firmicutes)(11.21% \pm 4.07%)、放线菌门 (Actinobacteria)(8.62% \pm 3.14%)、蓝细菌 (Cyanobacteria)(0.98% \pm 0.11%) 和螺旋体门 (Spirochaetes)(0.75% \pm 0.31%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)(0.31% \pm 0.20%) 等组成; 室内饲养高原鼠兔肠道微生物主要由拟杆菌门 (61.61% \pm 5.57%)、厚壁菌门 (21.82% \pm 3.15%)、变形菌门 (4.32% \pm 1.31%)、疣微菌门 (2.41% \pm 1.38%)、螺旋体门 (2.11% \pm 0.50%)、蓝细菌 (1.23% \pm 0.16%) 和放线菌门 (0.68% \pm 0.07%) 等组成 (图 1)。

在门的水平上, 室内鼠兔肠道微生物中拟杆菌门和螺旋体菌门的相对丰度显著高于野生鼠兔, 而变形菌门和放线菌门的相对丰度显著低于野生鼠兔 (表 2)。在属的水平上, 室内饲养高原鼠兔肠道微生物中 S24-7 中某属、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌科下某属、梭菌属 (*Clostridium*)、梭菌目下某属、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、瘤胃菌科下某属、肉杆菌属 (*Carnobacterium*) 的丰度均显著高于野生鼠兔, 而黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、丛毛单胞菌科下某属 (*Comamonadaceae*.Other)、节杆菌属

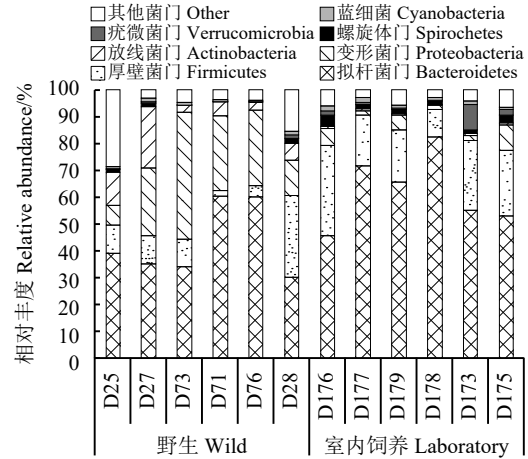


图 1 野生和室内饲养高原鼠兔肠道菌群在门水平上的组成成分 (仅显示相对含量 > 1% 的菌群)

Figure 1 Composition of bacterial communities at phylum level in the gut microbial communities between wild and laboratory-reared plateau pikas (Only those phyla with mean relative abundance > 1% were shown)

横坐标编号为菌群编号。

Code of horizontal ordinate are codes of bacterial communities.

(*Arthrobacter*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、毛螺旋菌科下某属 (*Lachnospiraceae*.Other) 的丰度均显著低于野生鼠兔 ($P < 0.05$) (表 2)。基于 OTUs 表的维恩图分析, 结果表明野生和室内饲养鼠兔的 OTUs 有 50.1% 重叠, 而 49.9% 的 OTUs 是各自特有的 (图 2)。

2.2 肠道微生物的多样性

野外和室内饲养高原鼠兔肠道微生物的 α 多样性指数均无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。为了评估 β 多样性, 分别计算了 weighted UniFrac 距离矩阵和 unweighted UniFrac 距离矩阵, 前者能更清楚地展示野生和室内饲养鼠兔肠道微生物的差异, 使用 weighted UniFrac 距离矩阵做 PCoA 主坐标分析能将野生和室内饲养的高原鼠兔肠道微生物明显分开 (图 3), 其 β 多样性具有显著差异。

3 讨论与结论

夏季野生和室内饲养的高原鼠兔肠道微生物在组成成分上有显著差异。在门的水平上, 野生高原鼠兔肠道微生物主要由拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门组成, 而室内饲养鼠兔肠道微生物主要由拟杆菌门和厚壁菌门组成。室内饲养鼠兔肠道微生物中拟杆菌门和螺旋体菌门显著高于野生鼠

表 2 野生和室内饲养鼠兔肠道微生物在主要门和属 (平均相对含量 > 1%) 水平上比较 (平均值 ± 标准误)
Table 2 Comparison of main phyla and genera (mean relative abundance > 1%) of gut microbial communities in wild and laboratory-reared plateau pikas (Mean ± SE)

分类 Taxon	野生 Wild	室内 Laboratory	F	P
门 Phyla				
放线菌门 Actinobacteria	0.086 2 ± 0.031 4	0.006 8 ± 0.000 7	6.396	0.030
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.430 6 ± 0.055 2	0.616 1 ± 0.055 7	5.597	0.040
蓝细菌 Cyanobacteria	0.009 8 ± 0.001 1	0.012 3 ± 0.001 6	1.636	0.230
厚壁菌门 Firmicutes	0.112 1 ± 0.040 7	0.218 2 ± 0.031 5	4.244	0.066
变形菌门 Proteobacteria	0.248 4 ± 0.057 0	0.043 2 ± 0.013 1	12.323	0.006
螺旋体门 Spirochetes	0.007 5 ± 0.003 1	0.021 1 ± 0.005 0	5.364	0.043
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.003 1 ± 0.002 0	0.024 1 ± 0.013 8	2.281	0.162
其他菌门 Other	0.098 1 ± 0.041 6	0.046 5 ± 0.006 4	1.505	0.248
属 Genera				
S24-7 科下某属 S24-7. Other	0.101 4 ± 0.026 3	0.417 4 ± 0.043 0	39.266	< 0.001
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	0.130 2 ± 0.057 2	0.000 7 ± 0.000 2	5.137	0.047
普雷沃氏菌属 <i>Prevotella</i>	0.031 3 ± 0.009 8	0.074 2 ± 0.011 6	7.975	0.018
拟杆菌科下某属 Bacteroidaceae. Other	0.021 7 ± 0.005 3	0.059 0 ± 0.006 3	20.562	0.001
梭菌属 <i>Clostridium</i>	0.023 8 ± 0.008 8	0.055 5 ± 0.005 8	9.097	0.013
梭菌目下某属 Clostridiales. Other. Other	0.018 2 ± 0.008 1	0.045 2 ± 0.008 8	5.120	0.047
从毛单胞菌科下某属 Comamonadaceae. Other	0.053 2 ± 0.021 9	0.001 1 ± 0.000 3	5.663	0.039
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	0.036 3 ± 0.010 5	0.000 5 ± 0.000 1	11.678	0.007
瘤胃菌科下某属 Ruminococcaceae. Other	0.008 6 ± 0.002 7	0.018 7 ± 0.003 0	6.320	0.031
金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i>	0.023 6 ± 0.006 9	0.000 2 ± 0.000 1	11.487	0.007
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.021 6 ± 0.006 2	0.000 7 ± 0.000 6	11.350	0.007
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	0.004 9 ± 0.001 2	0.021 0 ± 0.005 8	7.363	0.022
肉杆菌属 <i>Carnobacterium</i>	0.002 4 ± 0.000 7	0.010 2 ± 0.003 0	3.346	0.030
毛螺旋菌科下某属 Lachnospiraceae. Other	0.014 6 ± 0.006 4	0.000 1 ± 0.000 1	5.059	0.048

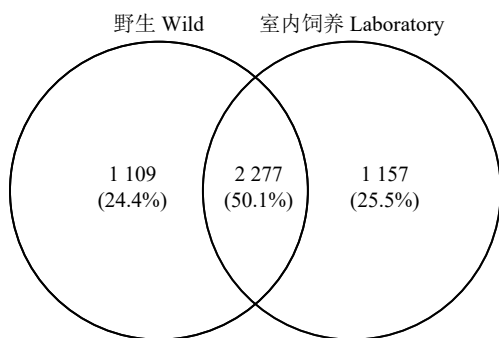


图 2 维恩图显示野生和室内饲养高原鼠兔肠道菌群 OTUs 的重叠

Figure 2 Venn diagram showing the overlapped OTUs of gut microbial communities between wild and laboratory-reared plateau pikas

兔，其中拟杆菌门中的 S24-7 的丰度高于野生鼠兔。S24-7 易受环境和食物的影响，Ormerod 等^[41]发现 S24-7 中有多种细菌会使降解碳水化合物的酶丰度增加，本研究中室内饲养食物无氮浸出物的含量显著高于野生食物，S24-7 能提高动物肠道对无氮浸出物中淀粉等碳水化合物的利用，这可能是导致室内饲养鼠兔肠道中 S24-7 的丰度显著高于野生个体的主要原因。放线菌门中大多数细菌可以降解纤维素^[42]，野生高原鼠兔肠道微生物中放线菌门丰度显著高于室内鼠兔，可能与野外食物资源中纤维成分高于室内饲料有关。野生鼠兔肠道菌群中黄杆菌属、金黄杆菌属、假单胞菌属、从毛单胞菌科下某属和毛螺旋菌科下某属的丰度均

显著高于室内饲养鼠兔。拟杆菌门中的黄杆菌属和金黄杆菌属、变形菌门中的假单胞菌属都是动物最常见的致病菌^[43-45]，这可能是导致夏季野生鼠兔高死亡率的原因之一^[46-47]。

维恩图结果表明，室内饲养和野生高原鼠兔肠道微生物的 OTUs 有 49.9% 是各自特有的，这可能是由于室内饲养与野生自然条件下，动物食物和环境的差异造成的。例如，对火鸡的研究发现，食物是引起驯养和野生火鸡肠道微生物差异的主要原因之一^[48]。对圈养和野生斑海豹肠道菌群的研

究亦表明，食物和环境是造成二者肠道微生物差异的主要原因，且圈养斑海豹肠道微生物的 OTUs 丰度增加^[49]，与本研究结果一致。

夏季野生和室内饲养高原鼠兔肠道微生物的 α 多样性均无显著差异，这可能有以下几个原因。首先，宿主具有选择专一性。动物会选择环境中有利的细菌，来维持肠道微生物 α 多样性的稳定。高原鼠兔的肠道微生物并没有选择环境中丰度较高的细菌，而是选择环境中罕见、对宿主有益的细菌^[30]。其次，微生物间的竞争。新环境中的微生

表 3 野生和室内饲养鼠兔肠道菌群的 α 多样性比较

Table 3 Comparison of alpha diversity of gut microbial communities between wild and laboratory-reared plateau pikas

多样性指数 Diversity index	野生 Wild	室内 Laboratory	F	P
谱系多样性 PD_whole_tree	74.747 ± 7.644	87.758 ± 1.619	2.773	0.127
菌群丰富度指数 Chao1	2 210.641 ± 231.442	2 402.784 ± 64.174	0.640	0.442
香农指数 Shannon	8.158 ± 0.352	8.325 ± 0.171	0.181	0.679
观察到的 OTU 数 Observed-species	1 176.333 ± 112.413	1 265.500 ± 32.276	0.581	0.463
文库覆盖率 Goods-coverage	0.868 ± 0.019	0.853 ± 0.006	0.578	0.465
辛普森指数 Simpson	0.981 ± 0.008	0.985 ± 0.003	0.214	0.654
均匀度指数 Equitability	0.801 ± 0.025	0.808 ± 0.014	0.053	0.823

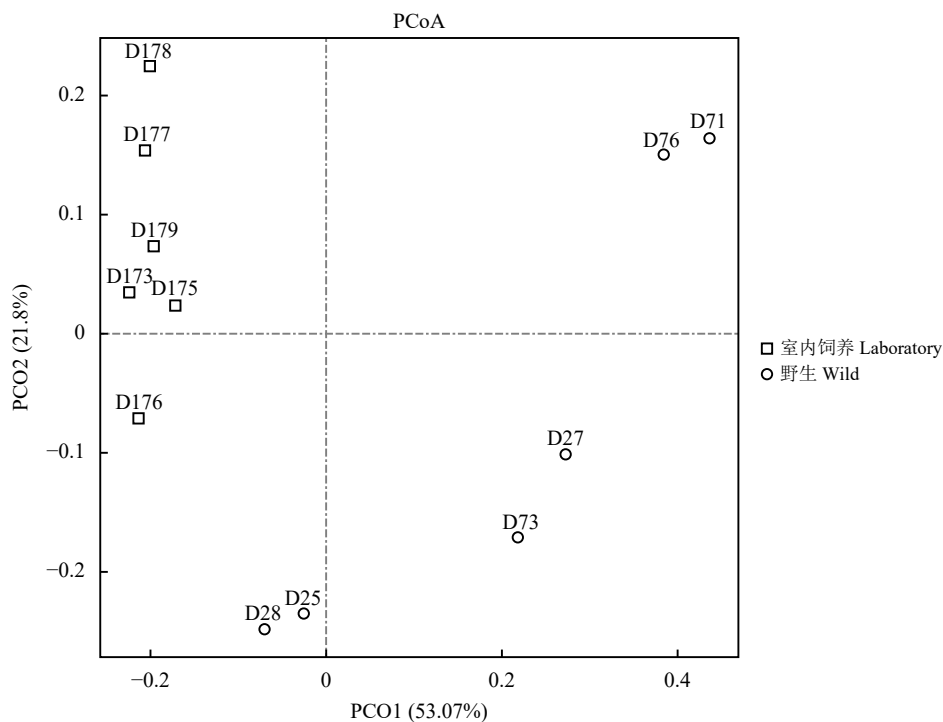


图 3 野生和室内饲养高原鼠兔肠道微生物基于加权 UniFrac 矩阵距离的主坐标分析

Figure 3 Principal coordinate analysis (PCoA) of the weighted UniFrac dissimilarity metrics compared with the gut microbial communities between wild and laboratory-reared plateau pikas

物与肠道中已有微生物形成竞争关系, 但新环境中的微生物很难排挤掉已有的微生物来获取生态位和资源, 从而维持 α 多样性的稳定, 导致两组肠道微生物的 α 多样性没有显著差异^[50]。最后, 某些环境罕见细菌不能吸附于肠道内, 也无法在肠道内繁殖。尽管野外与室内的环境和食物条件差异明显, 但野生鼠兔转移到室内后, 新的微生物无法在室内鼠兔肠道内定居、繁殖。例如, 在草鱼食物中加入枯草芽孢杆菌后, 在其肠道中并没有检测到枯草芽孢杆菌^[15]。

夏季野生和室内饲养高原鼠兔肠道微生物的群落结构 (β 多样性) 具有显著性差异, 可能有两种原

因。一方面, 野生和室内饲养鼠兔的食物不同, 食物的差异会导致肠道微生物群落结构变化^[51]; 另一方面, 野生和室内饲养鼠兔生活环境的不同, 环境微生物的不同也可能会影响肠道微生物群落结构^[52]。

本研究首次比较了夏季野生和室内饲养条件下高原鼠兔肠道微生物, 发现二者在微生物组成成分和群落结构上均有显著性差异, 室内饲养显著改变高原鼠兔的肠道微生物, 因此, 室内饲养不能有效反映野生状态下高原鼠兔肠道菌群的情况。在今后开展野生动物肠道菌群研究中, 需要考虑野生和实验室条件下二者的差异。

参考文献 References:

- [1] TREMAROLI V, BACKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012, 489: 242-249.
- [2] ZHANG H, SPARKS J B, KARYALA S V, SETTLAGE R, LUO X M. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 770-781.
- [3] GAGNIERE J, RAISCH J, VEZIANI J, BARNICH N, BONNET R, BUC E, BRINGER M A, PEZET D, BONNET M. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(2): 501-518.
- [4] 丁赟, 吴琦, 胡义波, 王潇, 聂永刚, 吴小平, 魏辅文. 野生哺乳动物肠道微生物组研究进展与展望. *兽类学报*, 2017, 37(4): 399-406.
DING Y, WU Q, HU Y B, WANG X, NIE Y G, WU X P, WEI F W. Advances and prospects of gut microbiome in wild mammals. *Acta Theriologica Sinica*, 2017, 37(4): 399-406.
- [5] TURNBAUGH P J, BACKHED F, FULTON L, GORDON J I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 2008, 3(4): 213-223.
- [6] MUEGGE B D, KUCZYNSKI J, KNIGHTS D, CLEMENTE J C, GONZALEZ A, FONTANA L, HENRISSAT B, KNIGHT R, GORDON J I. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 2011, 332(6032): 970-974.
- [7] CARMODY R N, GERBER G K, LUEVANO J M, GATTI D M, SOMES L, SVENSON K L, TURNBAUGH P J. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(1): 72-84.
- [8] PEREZ-COBAS A E, MAIQUES E, ANGELOVA A, CARRASCO P, MOYA A, LATORRE A. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(4): 1-14.
- [9] MONTLLOR C B, MAXMEN A, PURCELL A H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 2002, 27(2): 189-195.
- [10] TSUCHIDA T, KOGA R, FUKATSU T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 2004, 303: 1989-1989.
- [11] KOHL K D, VARNER J, WILKENING J L, DEARING M D. Gut microbial communities of American pikas (*Ochotona princeps*): Evidence for phyllosymbiosis and adaptations to novel diets. *Journal of Animal Ecology*, 2017, 87(2): 323-330.
- [12] NAYAK S K. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2-14.
- [13] WANG G X, LIU Y T, LI F Y, GAO H T, LEI Y, LIU X L. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(3): 378-387.
- [14] LIU C H, CHIU C H, WANG S W, CHENG W. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 699-706.

- [15] HAO K, WU Z Q, LI D L, YU X B, WANG G X, LING F. Effects of dietary administration of *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7, and *Bacillus subtilis*, single or combined, on the grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) intestinal microbiota. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 386-396.
- [16] VISPO C, KARASOV W H. The interactions of avian gut microbes and their host: An elusive symbiosis. *Gastrointestinal Microbiology*, 1997: 116-155.
- [17] WIENEMANN T, SCHMITT-WAGNER D, MEUSER K, SEGELBACHER G, SCHINK B, BRUNE A, BERTHOLD P. The bacterial microbiota in the ceca of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) differs between wild and captive birds. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(7): 542-551.
- [18] QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF K S, MANICHANH C, NIELSEN T, PONS N, LEVENEZ F, YAMADA T, MENDE D R, LI J, XU J, LI S, LI D, CAO J, WANG B, LIANG H, ZHENG H, XIE Y, TAP J, LEPAGE P, BERTALAN M, BATTO J M, HANSEN T, PASLIER D L, LINNEBERG A, NIELSEN H B, PELLETIER E, RENAULT P, SICHERITZ-PONTEN T, TURNER K, ZHU H, YU C, LI S, JIAN M, ZHOU Y, LI Y, ZHANG X, LI S, QIN N, YANG H, WANG J, BRUNAK S, DORE J, GUARNER F, KRISTIANSEN K, PEDERSEN O, PARKHILL J, WEISSENBACH J, CONSORTIUM M, BORK P, EHRlich S D, WANG J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65.
- [19] VIJAY-KUMAR M, AITKEN J D, CARVALHO F A, CULLENDER T C, MWANGI S, SRINIVASAN S, SITARAMAN S V, KNIGHT R, LEY R E, GEWIRTZ A T. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science*, 2010, 328: 228-231.
- [20] DIAZ HEIJTZ R, WANG S, ANUAR F, QIAN Y, BJORKHOLM B, SAMUELSSON A, HIBBERD M L, FORSSBERG H, PETTERSSON S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 3047-3052.
- [21] LI L, ZHAO X. Comparative analyses of fecal microbiota in Tibetan and Chinese Han living at low or high altitude by barcoded 454 pyrosequencing. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14682.
- [22] TANG W, XING Z, HU W, LI C, WANG J, WANG Y. Antioxidative effects in vivo and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 7193-7202.
- [23] SMITH A T, XIE Y. *A Guide to the Mammals of China*. Princeton: Princeton University Press, 2008.
- [24] 蒋志刚, 夏武平. 高原鼠兔食物资源利用的研究. *兽类学报*, 1985, 5(4): 251-262.
JIANG Z G, XIA W P. Utilization of the food resources by plateau pika. *Acta Theriologica Sinica*, 1985, 5(4): 251-262.
- [25] 王溪, 刘季科, 刘伟, 纪兰菊. 植食性小哺乳类营养生态学的研究: 高原鼠兔的食物选择模式与食物质量. *兽类学报*, 1992, 12(3): 183-192.
WANG X, LIU J K, LIU W, JI L J. Studies on the nutritional ecology research of herbivorous small mammals: Patterns of food selection and food quality for plateau pika, *Ochotona curzoniae*. *Acta Theriologica Sinica*, 1992, 12(3): 183-192.
- [26] SMITH A T, FOGGIN J M. The plateau pika (*Ochotona curzoniae*) is a keystone species for biodiversity on the Tibetan plateau. *Animal Conservation*, 1999, 2(4): 235-240.
- [27] SMITH A T, LAI C H. Keystone status of plateau pikas (*Ochotona curzoniae*): Effect of control on biodiversity of native birds. *Biodiversity and Conservation*, 2003, 12(9): 1901-1912.
- [28] LI H, LI T, BEASLEY D E, HEDENEC P, XIAO Z, ZHANG S, LI J, LIN Q, LI X. Diet diversity is associated with beta but not alpha diversity of pika gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1169.
- [29] LI H, QU J, LI T, LI J, LIN Q, LI X. Pika population density is associated with the composition and diversity of gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2016c, 7: 758.
- [30] LI H, LI T, YAO M, LI J, ZHANG S, WIRTH S, CAO W, LIN Q, LI X. Pika gut may select for rare but diverse environmental bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2016b, 7: 1269.
- [31] KOHL K D, DEARING M D. Experience matters: prior exposure to plant toxins enhances diversity of gut microbes in herbivores. *Ecology Letters*, 2012, 15(9): 1008-1015.
- [32] VILLERS L M, JANG S S, LENT C L, LEWIN-KOH S C, NOROSOARINALVO J A. Survey and comparison of major intestinal flora in captive and wild ring-tailed lemur (*Lemur catta*) populations. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 2008, 70(2): 175-184.
- [33] NADEEM O K, NIDHI S, JEREMY W C, JULIAN MC, STEPLEN M R, HAZEL M M. The interplay between campylobacter and helicobacter species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Systematic and Applied Microbiology*, 2016(6): 18.

- [34] TAMAKI H, WRIGHT C L, LI X, LIN Q, HWANG C, WANG S, THIMMAPURAM J, KAMAGATA Y, LIU W. Analysis of 16S rRNA amplicon sequencing options on the roche/454 next-generation titanium sequencing platform. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e25263.
- [35] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS S M, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT J A, SMITH G, KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [36] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [37] BENGTSSON-PALME J, HARTMANN M, ERIKSSON K M, PAL C, THORELL K, LARSSON D G, NILSSON R H. Metaxa2: Improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(6): 1403-1414.
- [38] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, QUINCE C, KNIGHT R. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [39] LI W, GODZIK A. CD-HIT: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [40] LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8228-8235.
- [41] ORMEROD K L, WOOD D L A, LACHNER N, GELLATLY S L, DALY J N, PARSONS J D, DALMOLIN C G O, PALFREYMAN R W, NIELSEN L K, COOPER M A, MORRISON M, HANSBRO P M, HUGENHOLTZ P. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome*, 2016, 4(1): 36.
- [42] ANDERSON I, ABT B, LYKIDIS A, KLENK H P, KYRPIDES N, IVANOVA N. Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39331.
- [43] WAKABAYASHI H, OTOTAKE M. Characteristics of extracellular products of *Flavobacterium* sp., a pathogen of bacterial gill disease. *Fish Pathology*, 1985, 20(2/3): 167-171.
- [44] VANCANNEYT M, SEGERS P, HAUBEN L, HOMMEZ J, DEVRIESE L A, HOSTE B, VANDAMME P, KERSTERS K. *Flavobacterium meningosepticum*, a pathogen in birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(10): 2398-2403.
- [45] KUNERT A, LOSSE J, GRUSZIN C, HUH N, KAENDLER K, MIKKAT S, VOLKE D, HOFFMANN R, JOKIRANTA T S, SEEBERGER H, MOELLMANN U, HELLWAGE J, ZIPFEL P F. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation factor *tuf* is a factor *h* and plasminogen binding protein. *European Journal of Immunology*, 2007, 37(5): 2979-2988.
- [46] QU J, LI W, YANG M, JI W, ZHANG Y. Life history of the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in alpine meadows of the Tibetan Plateau. *Mammalian Biology*, 2013, 78(1): 68-72.
- [47] QU J, RUSSELL J C, JI W, YANG M, CHEN Q, LI W, ZHANG Y. Five-year population dynamics of plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) on the east of Tibetan Plateau. *European Journal of Wildlife Research*, 2017, 63(3): 51.
- [48] SCUPHAM A J, PATTON T G, BENT E, BAYLES D O. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microbial Ecology*, 2008, 56(2): 322-331.
- [49] NELSON T M, ROGERS T L, CARLINI A R, BROWN M V. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: A comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(4): 1132-1145.
- [50] GHOUL M, MITRI S. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(10): 833-845.
- [51] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, TURNBAUGH P J, RAMEY R R, BIRCHER J S. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, 320(5883): 1647-1651.
- [52] AMATO K R, YEOMAN C J, KENT A, RIGHINI N, CARBONERO F, ESTRADA A, GASKINS H R, STUMPF R M, YILDIRIM S, TORRALBA M, WILSON B A, NELSON K E, WHITE B A, LEIGH S R, GILLIS M. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1344-1353.

(责任编辑 武艳培)