

雉科鸟类肠道微生物的多样性与功能 及其对食性的适应

沈佳斌¹, 张雪敬¹, 吴蔚¹, 胡婉婷¹, 张成林², 朱立峰¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(2. 北京动物园, 北京 100000)

[摘要] 肠道菌群对动物的生命活动有着极其重要的影响。本研究利用高通量测序手段, 对雉科(Phasianidae)鸟类粪便进行 16S rRNA 基因测序, 并结合其自身的杂食性饮食结构, 探究了雉科鸟类肠道菌群的情况, 共得到 189 860 条有效序列并定义 4 305 个 OTU(Operational Taxonomic Unit)。结果发现雉科鸟类肠道菌群中变形菌门的相对丰度高于许多已知的其他鸟类。尽管食性相同, 但雉科鸟类肠道菌群依然存在部分分化的现象, 说明宿主系统发生地位对肠道菌群结构起到了重要的作用。不仅如此, 更深入的宏基因组研究显示, 雉科肠道菌群功能中, 分解雉科摄入的有害物质的通路被富集, 以此来确保雉科鸟类的正常生命活动。

[关键词] 肠道菌群, 雉科, 功能

[中图分类号] Q958; Q938 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)02-0090-06

The Gut Microbes' Diversity and Function of Phasianidae Provide Insights on the Adaptation to Their Diet

Shen Jiabin¹, Zhang Xuejing¹, Wu Wei¹, Hu Wanting¹, Zhang Chenglin², Zhu Lifeng¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Beijing Zoo, Beijing 100000)

Abstract: Intestinal flora plays an important role on the life activities of animals. In this study, high throughput 16S rRNA gene sequencing method on feces was used to investigate the intestinal flora of Phasianidae birds considering their omnivorous diet structure. The study totally gained 189 860 sequences and defined 4 305 OTUs. It was found that the gut microbes of Phasianidae birds had relative high proportion of Proteobacteria compared with those from other birds. Although treated with the same diet, it was still found the partial divergence on their gut microbes, which reflecting indicating that the status of host phylogeny plays an important role in shaping the gut microbiome. Further metagenomics analysis revealed gut microbes of Phasianidae animals were potential enriched in these metabolism pathway on many harmful substances intaken, which ensures the normal life activities of the Phasianidae.

Key words: gut microbiota, Phasianidae, function

肠道菌群在动物的生命活动中占据重要地位。动物依赖肠道内的菌群完成复杂的生命活动, 肠道内的菌群可以帮助宿主消化、吸收来自食物中的营养物质, 帮助合成生命活动中所需的物质。此外, 肠道菌群还参与宿主的免疫、宿主肠道发育等活动^[1]。目前, 动物肠道菌群方面已进行大量的探究。在许多动物的肠道菌群中丰度最高的为厚壁菌门(Firmicute)以及拟杆菌门(Bacteroidete)^[2]。动物肠道菌群的形成受多种因素的影响, 其中宿主的系统发生地位以及宿主的食性被认为是影响动物肠道菌群组成的两大重要因素^[2-3]。其中, 食性对动物的肠道菌群的形成有极其重要的作用^[3]。动物适应其特有的食性的过程中, 肠道菌群起到十分重要的作用。Zhu 等发现食肉目的大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)能适应植食性的饮食,

收稿日期: 2016-05-25.

基金项目: 国家自然科学基金(31222009).

通讯联系人: 朱立峰, 博士, 教授, 研究方向: 动物生态学. E-mail: zhulif@ioz.ac.cn

其肠道菌群功不可没,大熊猫的肠道微生物中存在纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶等在内的多种糖苷水解酶编码基因^[4]。2014年,Roggenbuck等人对腐食性的黑头美洲鸢(*Coragyps Atratus*)以及红头美洲鸢(*Cathartes aura*)就腐肉中大量致病菌以及毒素的耐受性进行探究,结果发现尽管存在许多致病菌,但是他们肠道中的组成结构却异常稳定,不会因为外部菌群的摄入而发生变化,这一特性让美洲鸢能很好地适应腐食生活^[5]。以树叶为食的南美麝雉(*Opisthocomus hoazin*)的肠道前段有发酵的功能,其肠道菌群甚至与牛的瘤胃类似^[6]。雉科鸟类食性非常广泛,属于杂食性鸟类,雉科对多元化饮食的适应与其肠道菌群的关系有待深入研究。

动物肠道菌群的研究工作经历了最初的体外培养,逐渐发展到非培养的DNA分子技术的大力推广与应用,加快了肠道菌群研究的进展。随着高通量测序技术的广泛应用,16S rRNA基因测序技术已经发展为微生物鉴定以及多样性分析的一个可靠手段^[7]。现如今,随着宏基因组技术的发展,人们对肠道菌群的认识不仅仅局限于表层,还会与其功能相联系^[8]。但是,在雉科中,除去家鸡(*Gallus gallus*)^[9]、火鸡(*Meleagris gallopavo*)^[10]等被高度驯化的物种进行过探究之外,雉科其他的物种基本都未进行肠道菌群方面的研究。

雉科属于鸟纲,鸡形目,其下有38个属,159个种。中国是世界上雉科鸟类最丰富的国家之一,据统计,雉科鸟类21属,56种,约占世界雉科属数38属的55.3%,总种数159种的36.2%^[11]。其中,黄腹角雉(*Tragopan caboti*)、白冠长尾雉(*Syrnaticus reevesii*)等更是我国特有的珍稀保护动物,且均被IUCN收录为濒危物种,是国家非常重要的生物资源。在长期演化过程中,该类群所具有的一些生物学特性(体型大、地栖、飞翔能力差、不迁徙、繁殖率低)限制了种群的发展。除这些自然因素以外,导致雉科鸟类分布和数量缩减,一些种类濒临灭绝的还有一些人为因素,包括栖息地的破坏、非法捕猎、人为活动的干扰以及散放所引起的杂交等。目前雉科中许多属的鸟类都建立了一定规模的人工种群,但也有部分饲养尚未取得成功^[12],因此对雉科鸟类肠道菌群的探究为认识雉科鸟类的适应生存与保护提供了重要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

样品采集自北京动物园,共6个属,包括国家特有珍稀鸟类褐马鸡(*Crossoptilon mantchuricum*)、黄腹角雉、白冠长尾雉,以及蓝鹇(*Lophura swinhoii*)、白腹锦鸡(*Chrysolophus amherstiae*)、环颈雉(*Phasianus colchicus*)等12个粪便样品,每个属2个样品。具体方法为:寻找新鲜的粪便,利用灭菌刀片及时刮取表层与地面不接触的部分,装入离心管中后及时-80℃冷冻保存。

1.2 DNA的提取

DNA提取方法采用德国QIAGEN的粪便基因组DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit),提取后的DNA经Nano drop检测其纯度,Qubit检测其浓度并用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,选取合格的样品进行测序。

1.3 测序

测序采用了高通量测序技术,Miseq平台进行16S rRNA基因的测序工作。双向测序,测序引物选用515F:GTGCCAGCMGCCGCGG;907R:CCGTCAATTCMTTTRAGTTT。下机数据经过质控、拼接、过滤、去除嵌合体等处理后筛选出高质量的序列用于后续分析。

1.4 生物信息分析

高质量的有效序列使用QIIME(Quantitative Insights Into Microbial Ecology)^[13]进行分析。QIIME在16S rRNA基因序列的分析中得到广泛的应用。在这里,以97%的序列相似度为阈值进行OTUs(Operational Taxonomic Units)的聚类,对得到的序列进行不同分类水平上的鉴定,并利用Cytoscape^[14]构建network对雉科动物内细菌之间的相互关系进行探究^[11]。除此之外,还进行了肠道菌群alpha和beta多样性的分析,并利用抽取不同序列数目下观察到的OTUs数目等绘制稀释性曲线等以实现测序深度的评估。为将研究深入到其功能水平,本实验还通过PICRUST^[15]利用16S rRNA基因预测其宏基因组,并与KEGG数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)进行比对,寻找同源基因,并分析其可能参与的代谢通路。

2 结果

2.1 稀释性曲线

本实验一共得到有效序列 189 860 条,共定义了 4 305 个 OTU. 稀释性曲线显示当样品测序条数在将近 2 000 左右时开始趋于平缓,表明测序条数的增加对于 OTUs 的发现贡献很小(图 1a). 这里还用香农指数来表示样品中的多样性,发现在将近 2 000 左右出现拐点,之后曲线趋于平缓(图 1b),覆盖了所有 OTU 的 94.91%,表明测序条数已经涵盖了绝大多数的微生物,也充分展现了其多样性,保证了后续分析的可靠性.

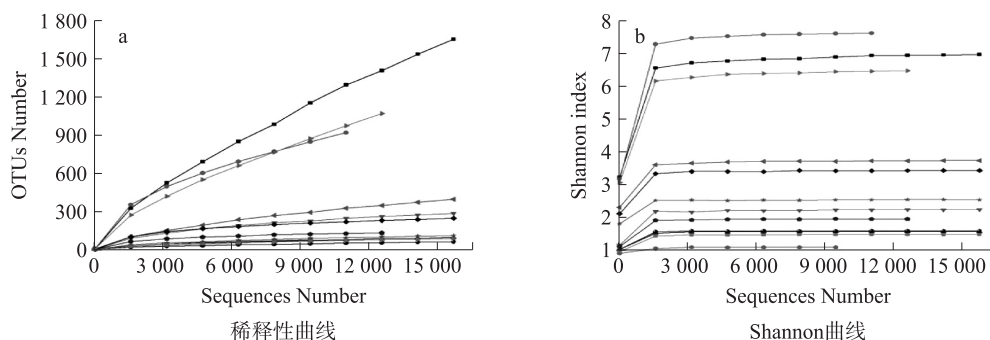


图1 所有样品的稀释性曲线和Shannon曲线

Fig.1 Rarefaction and Shannon curves of all samples

2.2 雉科肠道菌群组成

研究发现,雉科肠道菌群组成(图2)如下:在门的水平上,含量最高的是变形菌门(Proteobacteria)(54.66%),其次是厚壁菌门(24.02%)、拟杆菌门(12.07%)等.与哺乳动物肠道菌群相比,雉科鸟类肠道菌群中变形菌门的丰度较高.

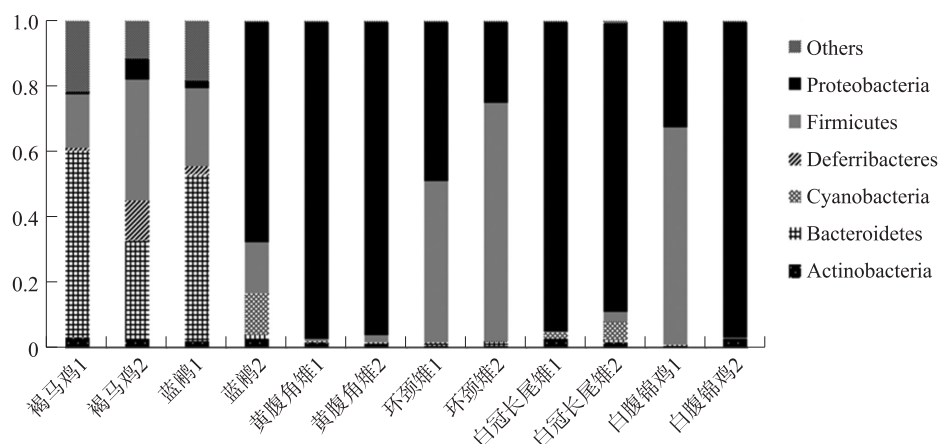


图2 雉科鸟类的肠道菌群组成

Fig.2 The composition of the gut flora in Phasianidae

2.3 雉科肠道内菌群间的相互关系

生活在同一环境中的菌群彼此之间也存在联系,菌群之间的关系主要分为正相关关系,即:共生、互利共生、互利共生等;还有负相关关系:竞争、寄生等.通过 Cytoscape 中的 CoNet 插件进行基于细菌相对丰度的 network 的构建,可以探究菌群之间的相互关系(Spearman cut off $\rho=0.6$, $P<0.05$)(图3).结果发现,在雉科肠道菌群中,正相关关系占大多数(75.69%).

2.4 属间差异分析

利用雉科鸟类肠道菌群 16S rRNA 基因的序列构建了 UPGMA 树(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)(图4a).结合主坐标分析(Principal Coordinates Analysis, PCoA)(图4b),结果发现除两个褐马鸡样品与一个蓝鹇样品距离较远外,其他样品距离都很近,而且同一属的两个样品有靠拢的趋势.

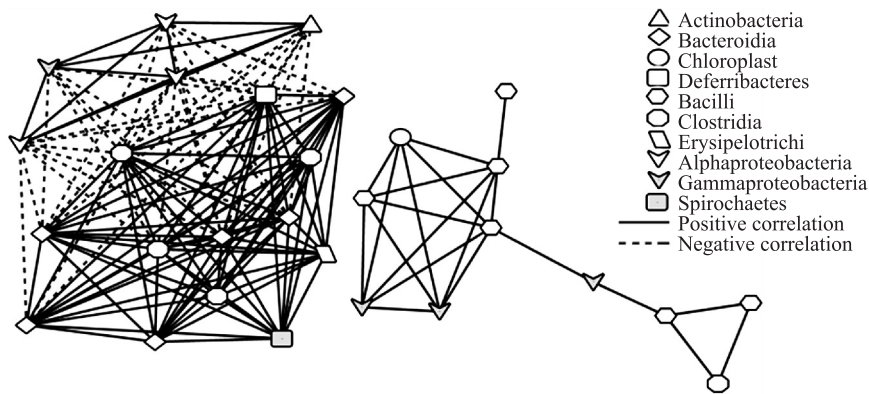


图3 雉科肠道菌群network图

Fig.3 The network of gut microbiota in Phasianidae

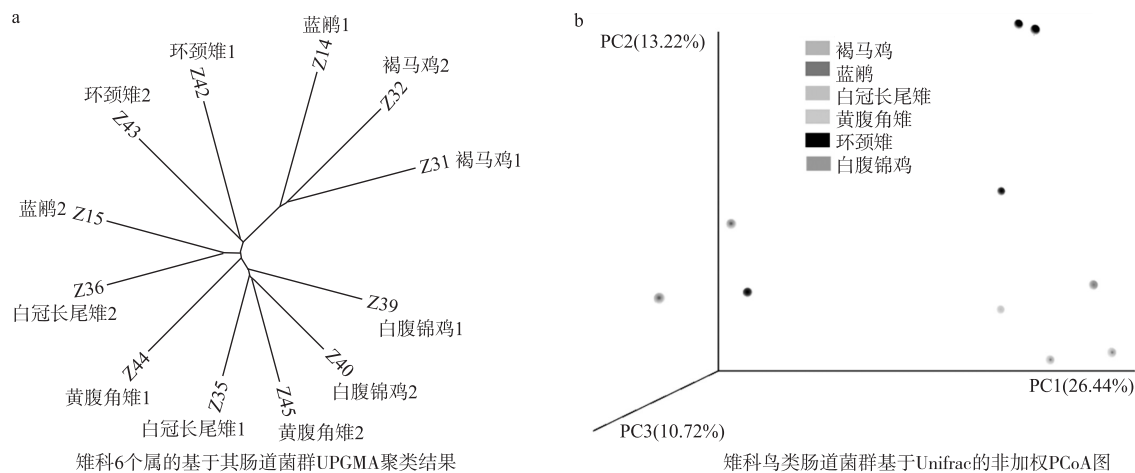


图4 雉科6个属的基于其肠道菌群UPGMA聚类结果和雉科鸟类肠道菌群基于Unifracs的非加权PCoA图

Fig.4 Cluster of UPGMA tree based on the gut microbiota among the six genus in Phasianidae and unweighted unifracs PCoA of microbiota in Phasianidae

2.5 雉科鸟类肠道菌群功能

利用 PICRUSt 进行了宏基因组的预测,并进行了同源基因的寻找,进而分析可能参与的代谢通路,最终将参与某一通路的基因拷贝数目在总体中的比值计算出菌群参与该通路的比重.结果发现雉科肠道菌群可能参与的代谢通路多达 200 多项,涉及到方方面面,包括脂肪酸的代谢、多糖的代谢、蛋白酶以及肽酶的产生等.尤其,雉科鸟类肠道菌群参与许多有害物质的分解代谢(表 1).

表 1 雉科动物参与的部分有害物质分解通路

Table 1 The degradation pathways of some harmful substances Phasianidae participating in

Pathway	mean/%	std
双酚 A 的降解	0.097 214	0.028 138
己内酰胺的降解	0.195 504	0.114 402
氯代烷和氯代烯烃的降解	0.240 263	0.042 226
氯代环己烷和氯苯的降解	0.058 716	0.032 042
二恶英的降解	0.066 438	0.021 563
氟苯甲酸及降解	0.020 196	0.019 69
香叶醇的降解	0.267 266	0.152 588
多环芳烃的降解	0.111 781	0.020 907
二甲苯的降解	0.051 368	0.013 539
苯乙烯的降解	0.091 841	0.050 098
乙苯的降解	0.061 937	0.028 667

3 讨论

3.1 高丰度的变形菌门

变形菌门被认为是功能高度复杂的一个细菌分类^[16]. 在其他不同食性的鸟类(腐食性美洲鹫^[4]、肉食的企鹅(*Pygoscelis adeliae*)^[17]以及杂食的家鸡^[9]、斑胸草雀(*Poephila guttata*)^[18]等), 丰度最高的是厚壁菌门, 而高丰度的变形菌门可能是为了应对雉科鸟类复杂的饮食. 雉科鸟类食性非常广, 从植物、肉类至昆虫等, 多元化的食物进入其肠道后对生活在肠道中的菌群也提出了一定要求, 而肠道菌群组分的变化可能就是为了满足这个目的. 研究发现雉科菌群之间大多为正相关关系, 但负相关关系也占到了 24.31%, 负相关关系的细菌主要发生在梭菌纲(*Clostridia*)等细菌中, 与其偏向竞争的天性相吻合^[4]. 最近有研究发现, 菌群之间不是正相关关系越多对整个菌群结构越好, 负相关关系特别是竞争关系对整个菌群结构的稳定起到了非常重要的作用^[19].

3.2 雉科属间差异

在 UPGMA 树以及 PCoA 分析中, 尽管发现有 3 个样品(1 个蓝鹇样品、2 个褐马鸡样品)出现了一定程度上的聚集, 且同一属的两个样品彼此靠的比较近. 在进化关系上, 马鸡属与鹇属比较接近, 且与其他属相对较远^[20]. 虽然食性完全相同, 但宿主分类地位的不同仍旧对肠道菌群有影响^[8]. 雉科肠道菌群对于其食性的适应研究发现, 处于不同食性下的动物肠道菌群组成存在分化^[3]. 动物的祖先被认为是肉食性的^[2], 雉科动物能适应其多样化的饮食结构, 肠道菌群起到了极其巨大的作用. 研究发现雉科鸟类肠道菌群可能参与的代谢通路达到 200 多项, 例如脂肪酸的代谢(Fatty acid metabolism)、多糖的代谢(Carbohydrate metabolism), 以及蛋白水解酶(Peptidase)的产生等可以针对植食性、肉食性食物甚至昆虫等进行分解、吸收, 表现出雉科鸟类肠道菌群对其食性很好的适应. 更重要的是, 在所有的代谢通路中, 化学物质的降解占到了非常大的比重(约 12.63%). 这一高比重的代谢通路一方面突出了肠道菌群功能的重要作用, 另一方面也说明雉科鸟类对有害物质的高摄入量, 这可能与其生活习性、饮食习惯有关^[12]. 雉科动物不善于飞行, 活动范围主要在地面, 土壤中的大量有害物质都可能或直接通过食物链在雉科鸟类中富集, 而肠道菌群的特异性适应则很好地提高了雉科鸟类对于有害物质的耐受能力, 确保了雉科鸟类的正常生命活动.

[参考文献]

- [1] QUIGLEY E M M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota[J]. *Pharmacological research*, 2010, 61(3): 213-218.
- [2] LEY R E, HAMADY M, LOZUPONE C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. *Science*, 2008, 320(5883): 1647-1651.
- [3] DAVID L A, MAURICE C F, CARMODY R N, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome[J]. *Nature*, 2014, 505(7484): 559-563.
- [4] ZHU L, WU Q, DAI J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2011, 108(43): 17714-17719.
- [5] ROGGENBUCK M, SCHNELL I B, BLOM N, et al. The microbiome of New World vultures[J]. *Nature communications*, 2014, 18: 5.
- [6] GODOY V F, GOLDFARB K C, KARAOZ U, et al. Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 531-541.
- [7] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [8] 许波, 杨文娟, 李俊俊, 等. 宏基因组学在人和动物胃肠道微生物研究中的应用进展[J]. *Chinese journal of biotechnology*, 2013, 29(12): 1721-1735.
- [9] ZHU X Y, ZHONG T, PANDYA Y, et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2002, 68(1): 124-137.
- [10] DANZEISEN J L, CALVERT A J, NOLL S L, et al. Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to

- weight gain[J]. Peer J, 2013(1):e237.
- [11] 马纲,张敏. 中国雉科鸟类特有种分布的研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2009, 35(3):495-499.
- [12] 张正旺,丁长青,丁平,等. 中国鸡形目鸟类的现状与保护对策[J]. 生物多样性, 2003, 11(5):414-421.
- [13] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature methods, 2010, 7(5):335-336.
- [14] SAITO R, SMOOT M E, ONO K, et al. A travel guide to Cytoscape plugins[J]. Nature methods, 2012, 9(11):1 069-1 076.
- [15] LANGILLE M G I, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature biotechnology, 2013, 31(9):814-821.
- [16] KERSTERS K, de VOS P, GILLIS M, et al. Introduction to the proteobacteria[M]//The prokaryotes. New York: Springer, 2006:3-37.
- [17] BANKS J C, CARY S C, HOGG I D. The phylogeography of Adelie penguin faecal flora[J]. Environmental microbiology, 2009, 11(3):577-588.
- [18] BENSKIN C M W, RHODES G, PICKUP R W, et al. Diversity and temporal stability of bacterial communities in a model passerine bird, the zebra finch[J]. Molecular ecology, 2010, 19(24):5 531-5 544.
- [19] COYTE K Z, SCHLUTER J, FOSTER K R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. Science, 2015, 350(6 261):663-666.
- [20] HUANG Z, LIU N, XIAO Y, et al. Phylogenetic relationships of four endemic genera of the Phasianidae in China based on mitochondrial DNA control-region genes[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2009, 53(2):378-383.

[责任编辑:黄 敏]