

普布扎西, 王新平, 赵思越, 王宇皓, 斯郎江措, 巴桑次仁, 次仁普赤, 唐鸿杰, 李娜, 柴立旭. 阿旺绵羊肠道噬菌体多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2025, 31 (1): 131-142

Pubu Zhaxi, Wang XP, Zhao SY, Wang YH, Silang Jiangcuo, Basang Ciren, Ciren Puchi, Tang HJ, Li N, Chai LX. Diversity of intestinal phages in Awang sheep [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2025, 31 (1): 131-142

阿旺绵羊肠道噬菌体多样性

普布扎西¹, 王新平¹, 赵思越², 王宇皓², 斯郎江措¹, 巴桑次仁¹, 次仁普赤³, 唐鸿杰⁴, 李娜¹, 柴立旭^{1✉}

¹西藏昌都市畜牧总站, 昌都 854000;

²四川农业大学, 雅安 611830;

³西藏昌都市贡觉县农牧科技推广服务中心, 昌都 854200;

⁴昌都市科学技术局, 昌都 854000

摘要 噬菌体在维持宿主肠道微环境中发挥着重要作用。基于宏基因组学方法全面研究阿旺绵羊肠道噬菌体。共注释到1 050种噬菌体, 主要来自10个门、11个科、225个属和1 050个种。大多数噬菌体主要来自长尾病毒科Siphoviridae、短尾噬菌体科Podoviridae和肌尾噬菌体科Myoviridae, 所占比例分别为29.9%、12.8%和9.1%。其中未分类到科的噬菌体占34.4%。225个属主要为塞昆克病毒属Cequiquevirus (2.8%)、痘苗病毒属Vaccinivirus (2.8%)、副痘病毒属Parapoxvirus (1.8%)和布鲁纳病毒属Friunavirus (1.1%)等。在种水平上, 1 050个噬菌体注释到的种包括有尾噬菌体Caudovirales_phage (9.4%)、克拉斯噬菌体CrAss_phage (3.4%)和蛭弧菌噬菌体Bdellovibrio_phage (1.3%)等。此外, 不同养殖方式之间, 噬菌体群落结构存在显著差异(科水平: $R = 0.853$, $P < 0.01$; 属水平: $R = 0.832$, $P < 0.01$; 种水平: $R = 0.840$, $P < 0.01$)。在 α 多样性指数方面, 不同养殖方式的Chao1指数与Shannon指数存在着显著差异。本研究揭示了阿旺绵羊肠道噬菌体的群落结构特征以及养殖方式对肠道噬菌体群落结构的重要影响, 为利用肠道噬菌体进行疾病防控提供了新的视角, 也为保障阿旺绵羊肠道健康提供了重要的理论依据。(图17 表1 参24)

关键词 阿旺绵羊; 宏基因组学; 噬菌体; 肠道微生物

Diversity of intestinal phages in Awang sheep

Pubu Zhaxi¹, WANG Xinping¹, ZHAO Siyue², WANG Yuhao², Silang Jiangcuo¹, Basang Ciren¹, Ciren Puchi³, TANG Hongjie⁴, LI Na¹ & CHAI Lixu^{1✉}

¹Changdu Animal Husbandry Station, Changdu 854000, China;

²Sichuan Agricultural University, Ya'an, 611830 China;

³Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology Promotion Service Center of Gongjue County, Changdu 854200, China;

⁴Changdu Science and Technology Bureau, Changdu 854000, China

Abstract Bacteriophages play important roles in maintaining the host intestinal microenvironment. Few studies have reported intestinal bacteriophages in sheep. In this study, we comprehensively explored intestinal bacteriophages in Awang sheep using metagenomics. We identified a total of bacteriophages, mainly from 11 families, 225 genera, and 1 050 species. Most bacteriophages belonged to Siphoviridae, Podoviridae, and Myoviridae, accounting for 29.9%, 12.8%, and 9.1%, respectively. Among these, 34.4% were bacteriophages that were not classified into families. These 225 genera were mainly Cequiquevirus (2.8%), Vaccinivirus (2.8%), Parapoxvirus (1.8%), and Friunavirus (1.1%). Among the 1 050 phages, Caudovirales_phage (9.4%) was the dominant species, followed by CrAss_phage (3.4%) and Bdellovibrio_phage (1.3%). Significant differences were observed in the structure of the bacteriophage community among the different breeding models of Awang sheep (family: $R = 0.853$, $P < 0.01$; genus: $R = 0.832$, $P < 0.01$; species: $R = 0.840$, $P < 0.01$). Significant differences were also noted in the alpha and Shannon diversity indices among all the breeding models. This study revealed the community structure characteristics of intestinal phages in Awang sheep and the significant impact of feeding models on the community structure of intestinal phages, providing a new perspective for the prevention and control of diseases using intestinal phages as well as an important theoretical basis for ensuring the intestinal health of Awang sheep.

Keywords Awang sheep; metagenomics; phage; gut microbiota

收稿日期 Received: 2024-01-03 接受日期 Accepted: 2024-04-30

西藏昌都市科技计划项目(405001006)资助 Supported by the Science and Technology Project of Changdu, Xizang, China (405001006)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: 496371844@qq.com)

动物肠道内定殖着大量微生物^[1],主要为细菌、真菌、病毒以及部分原生动物^[2]。同为病毒的噬菌体是地球上最丰富的生物之一,拥有极高的生物多样性^[3]。肠道噬菌体对肠道微生物的生态平衡起着至关重要的作用,如炎症性肠病患者肠道中尾病毒噬菌体的丰富度增加,噬菌体通过攻击宿主菌体可以限制细菌的行为和致病性^[4],有助于宿主构建健康的菌群结构^[5]。可见,噬菌体与细菌之间的相互作用对宿主健康有显著影响。

阿旺绵羊是青藏高原的特色畜种,主要分布于昌都市贡觉县境内及周边地区,是我国的宝贵畜种资源之一,同时也是当地的重要经济动物^[6]。鉴于阿旺绵羊在青藏高原及当地经济中的重要地位,研究其肠道噬菌体群落结构不仅有助于揭示这一宝贵畜种资源的生物学特性,还能为保护该物种胃肠道乃至生理健康提供科学依据。然而,目前关于阿旺绵羊肠道噬菌体的物种丰度、多样性数据、优势种群及进化关系尚不明确,其与宿主健康指标存在的关联则更不清楚。因此,亟须开展有关阿旺绵羊肠道噬菌体多样性的研究,以完善阿旺绵羊肠道噬菌体群落结构信息。

随着测序技术的快速发展,关于高通量测序方法的研究陆续涌现,这也使得肠道微生物群落多样性的研究成为可能^[7]。宏基因组学测序技术基于Illumina Hiseq测序平台,能够获得环境或样品中微生物群落的所有基因组信息,同时能将测序所得的物种序列注释到种水平^[8]。宏基因组学研究手段近期在肠道微生物的相关研究中应用得较为频繁且大部分研究对象主要为细菌、真菌^[9-11]。但也有少量将宏基因组学应用于人体肠道噬菌体组探究方面的报道^[5, 12]。然而目前尚未见阿旺绵羊肠道噬菌体组学方面的研究,因此,亟须运用组学手段来探究阿旺绵羊肠道噬菌体的群落分布。

鉴于此,我们借助宏基因组学研究手段对阿旺绵羊肠道噬菌体多样性进行深入分析,通过150个样本

测序规模来揭示阿旺绵羊肠道噬菌体组的物种丰度、多样性、优势种群及相关种群的进化关系,为进一步研究噬菌体的功能以及阿旺绵羊肠道疾病防控提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采样由西藏昌都市畜牧总站组织完成,采样时间为2023年6月,样本采集地点分别为贡觉县阿旺乡(纯放牧:分组fm)(30°54'N, 98°52'E)、昌都市觉拥种畜场(半舍饲:分组bs)(31°34'N, 97°93'E)以及贡觉县藏东生物科技有限公司(全舍饲:分组qs)(30°89'N, 98°26'E)。在阿旺绵羊排便时,使用无菌采样袋搜集新鲜粪便样品,并编号记录,此次采样共采集粪便150个,采集后立即将样品用液氮进行速冻,然后运送至实验室,-80℃保存。采样的详细信息见表1。

1.2 DNA提取及宏基因组测序

使用Qiagen公司的PowerFecal® Pro DNA Kit (Qiagen, Inc.) DNA提取试剂盒对采集的粪便样品进行DNA提取。提取步骤严格按照试剂盒DNA提取说明书步骤进行。获得的DNA进行质量检测,检测合格后送欧易生物公司(oe-biotech, Inc.)进行测序,测序平台为Illumina Hiseq 测序平台。

1.3 数据质控

使用SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>) 截去3'和5'端的Barcode,同时剔除低质量的读取(如长度< 50 bp或质量值< 20或有N个碱基) (<https://github.com/najoshi/sickle>),同时去除宿主及无关的基因组。使用基于De Bruijn-graph的汇编器SOAPdenovo (<http://soap.genomics.org.cn>, Version 1.06) 组装短读。每个样本的K-mers的读长在1/3-2/3之间。保留长度超过500 bp的scaffold进行统计学检验,我们对每个装配产生的scaffold的质量

表1 样品采集详细信息

Table 1 Details of the samples collected

样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)	样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)	样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)
aw_fm_01	♀	1	20	aw_bs_01	♂	2	30	aw_qs_01	♀	2	28
aw_fm_02	♀	2	19	aw_bs_02	♀	2	28	aw_qs_02	♀	2	33
aw_fm_03	♀	2	20	aw_bs_03	♀	2	32	aw_qs_03	♀	2	39
aw_fm_04	♂	1	10	aw_bs_04	♂	1	28	aw_qs_04	♀	2	43
aw_fm_05	♂	1	18	aw_bs_05	♀	1	33	aw_qs_05	♀	2	37
aw_fm_06	♀	6	18	aw_bs_06	♀	1	33	aw_qs_06	♀	2	31
aw_fm_07	♀	1	20	aw_bs_07	♀	2	35	aw_qs_07	♀	2	38
aw_fm_08	♀	6	20	aw_bs_08	♀	2	26	aw_qs_08	♀	2	39

续表1 Table 1 (continued)

样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)	样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)	样品编号 Sample ID	性别 Gender	年龄 Age	体质量 Body mass (m/kg)
aw_fm_09	♂	1	15	aw_bs_09	♀	2	34	aw_qs_09	♀	2	37
aw_fm_10	♀	5	25	aw_bs_10	♀	1	31	aw_qs_10	♀	2	35
aw_fm_11	♀	3	25	aw_bs_11	♀	2	28	aw_qs_11	♀	2	18
aw_fm_12	♀	3	21	aw_bs_12	♀	4	41	aw_qs_12	♀	2	38
aw_fm_13	♀	3	30	aw_bs_13	♀	4	44	aw_qs_13	♀	2	41
aw_fm_14	♂	2	28	aw_bs_14	♀	2	29	aw_qs_14	♀	2	30
aw_fm_15	♂	1	15	aw_bs_15	♀	3	41	aw_qs_15	♀	2	33
aw_fm_16	♀	6	30	aw_bs_16	♀	2	35	aw_qs_16	♀	2	27
aw_fm_17	♀	2	24	aw_bs_17	♀	2	33	aw_qs_17	♀	2	30
aw_fm_18	♀	3	33	aw_bs_18	♀	3	37	aw_qs_18	♀	2	55
aw_fm_19	♀	4	30	aw_bs_19	♀	3	39	aw_qs_19	♀	2	27
aw_fm_20	♀	2	28	aw_bs_20	♀	3	45	aw_qs_20	♀	2	30
aw_fm_21	♀	5	25	aw_bs_21	♀	3	42	aw_qs_21	♀	2	45
aw_fm_22	♀	3	30	aw_bs_22	♀	3	37	aw_qs_22	♀	2	47
aw_fm_23	♂	3	35	aw_bs_23	♀	2	46	aw_qs_23	♀	2	29
aw_fm_24	♂	1	25	aw_bs_24	♂	2	41	aw_qs_24	♀	2	27
aw_fm_25	♀	1	20	aw_bs_25	♂	2	33	aw_qs_25	♀	2	33
aw_fm_26	♀	2	28	aw_bs_26	♀	2	35	aw_qs_26	♀	2	36
aw_fm_27	♂	2	20	aw_bs_27	♀	2	44	aw_qs_27	♀	2	54
aw_fm_28	♂	1	25	aw_bs_28	♀	3	38	aw_qs_28	♀	2	32
aw_fm_29	♀	7	35	aw_bs_29	♀	4	51	aw_qs_29	♀	2	30
aw_fm_30	♀	6	33	aw_bs_30	♀	1	37	aw_qs_30	♀	2	40
aw_fm_31	♀	1	20	aw_bs_31	♀	3	44	aw_qs_31	♀	2	30
aw_fm_32	♀	7	32	aw_bs_32	♀	2	41	aw_qs_32	♀	2	50
aw_fm_33	♀	5	35	aw_bs_33	♀	2	31	aw_qs_33	♀	2	42
aw_fm_34	♀	1	15	aw_bs_34	♀	3	38	aw_qs_34	♀	2	29
aw_fm_35	♀	2	25	aw_bs_35	♀	3	44	aw_qs_35	♀	2	28
aw_fm_36	♂	2	35	aw_bs_36	♀	2	41	aw_qs_36	♀	2	30
aw_fm_37	♀	2	20	aw_bs_37	♀	3	47	aw_qs_37	♀	2	39
aw_fm_38	♀	3	20	aw_bs_38	♂	3	41	aw_qs_38	♀	2	35
aw_fm_39	♀	2	25	aw_bs_39	♂	2	34	aw_qs_39	♀	2	28
aw_fm_40	♀	7	28	aw_bs_40	♀	3	39	aw_qs_40	♀	2	43
aw_fm_41	♂	2	35	aw_bs_41	♂	2	41	aw_qs_41	♀	2	36
aw_fm_42	♀	5	28	aw_bs_42	♂	2	36	aw_qs_42	♀	2	47
aw_fm_43	♀	4	25	aw_bs_43	♂	3	50	aw_qs_43	♀	2	53
aw_fm_44	♀	4	30	aw_bs_44	♂	2	37	aw_qs_44	♀	2	32
aw_fm_45	♀	5	33	aw_bs_45	♂	3	45	aw_qs_45	♀	2	34
aw_fm_46	♀	1	20	aw_bs_46	♂	2	41	aw_qs_46	♀	2	35
aw_fm_47	♀	7	33	aw_bs_47	♀	2	33	aw_qs_47	♀	2	44
aw_fm_48	♀	6	30	aw_bs_48	♂	2	39	aw_qs_48	♀	2	35
aw_fm_49	♂	1	23	aw_bs_49	♀	2	39	aw_qs_49	♀	2	42
aw_fm_50	♂	1	25	aw_bs_50	♀	2	44	aw_qs_50	♀	2	34

以“aw_fm_”开头的样品来自贡觉县阿旺乡（纯放牧），“aw_bs_”来自昌都市觉拥种畜场（半舍饲），“aw_qs_”来自贡觉县藏东生物科技有限公司（全舍饲）。♂代表雄性，♀代表雌性。年龄范围：0-1岁为幼年绵羊，2-8岁为成年绵羊。fm绵羊以高原草甸为食，bs绵羊以高原草甸、青干草和芫根为食，qs绵羊以颗粒饲料为食。

Samples starting with “aw_fm_” come from Awang Town, Gongjue County (pure grazing), “aw_bs_” from Jueyong Breeding Farm in Changdu City (semi-house feeding), and “aw_qs_” from Zangdong Biotechnology Co., Ltd. in Gongjue County (full house feeding). ♂ stands for the male, ♀ stands for the female. Age range: 0-1 years old for juvenile sheep, 2-8 years old for adult sheep. fm sheep feed on plateau meadows, bs sheep feed on plateau meadows, green hay, and coriander roots, and qs sheep feed on pelleted feed.

和数量进行了评估,最终选择了最佳的K-mer,得到了scaffold数量的最小值以及N50和N90的最大值.然后提取长度超过500 bp的scaffold,将其破碎成无间隙的contig.并利用该基因序列进行进一步的基因预测和注释.

1.4 生物信息学分析

基因分类及噬菌体注释主要参考文献[13]进行.具体步骤如下:使用MetaGene (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/>) 预测每个元基因组样本的开放阅读框(ORFs);使用NCBI数据库检索长度为或超过100 bp的预测ORFs,并将其翻译为氨基酸序列;通过CD-HIT (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>) 将来自具有95%序列标识(90%覆盖率)的基因集的所有序列聚集为非冗余基因目录;使用bowtie2 (v 2.2.9, <https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) 将质控后的Reads映射到代表性基因,并对每个样本中的基因丰度进行评估.使用Soap denovo 2软件重新组装这些非冗余序列;基于NCBI的NR库对应的分类学信息数据库获得噬菌体注释,以此计算各分类水平上噬菌体的基因丰度.

1.5 数据统计及可视化

相关的统计分析及作图主要用Microsoft Excel (Microsoft, Inc.)和R软件 (<https://www.r-project.org>) 进行,Venn图于Draw Venn Diagram网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 进行在线绘制.此外,LefSE分析于Galaxy网站进行相关在线分析 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

2 结果与分析

2.1 测序数据质量

在所有样本中共获得104.4 Gbs (Gigabytes) 的高质量序列,平均每个样本约为0.69 Gbs.每个样本的短序列(short reads)被重新组装到较长的拼接片段(contigs)中进行进一步的分析和注释.最终共获得2.7亿个contigs,平均372.2个contig N50.剔除宿主基因后,得到134.6亿个reads,共计2.3亿个开放阅读框.

2.2 阿旺绵羊肠道噬菌体群落结构

本次测序共获得1 050种噬菌体,主要来自10个门、11个科、225个属和1 050个种.大多数噬菌体主要来自长尾病毒科Siphoviridae、短尾噬菌体科Podoviridae和肌尾噬菌体科Myoviridae,所占比例分别为29.9%、12.8%和9.1%;其中,未分类到科的噬菌体占34.4% (图1、图2).

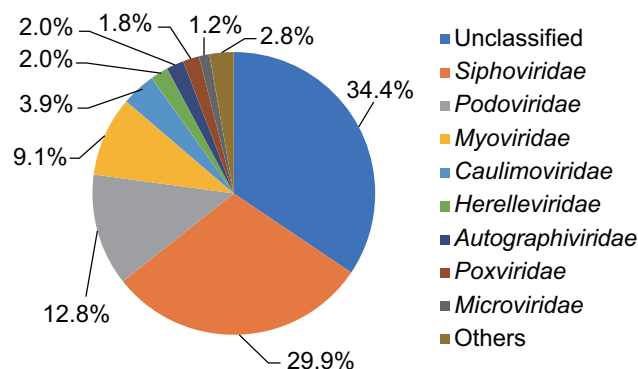


图1 总体肠道噬菌体主要分类科相对丰度。
Fig. 1 The most abundant family of phage.

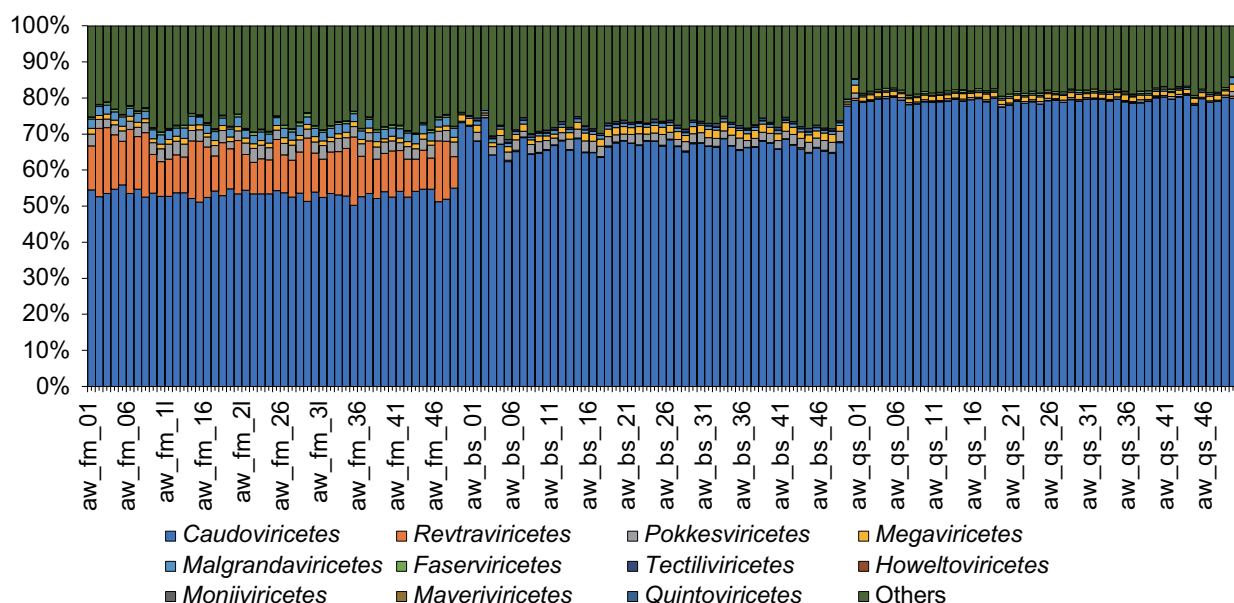


图2 各样品中主要科水平的相对丰度。
Fig. 2 The most abundant family of phage in each sample.

225个属主要为塞昆克病毒属*Cequinquevirus* (2.8%)、痘苗病毒属*Vaccinivirus* (2.8%)、副痘病毒属*Parapoxvirus* (1.8%)和弗鲁纳病毒属*Friunavirus* (1.1%)等(图3、图4)。

在种水平上, 1 050个噬菌体注释到的种包括有尾噬菌体*Caudovirales_phage* (9.4%)、克拉斯噬菌体*CrAss_phage* (3.4%)和蛭弧菌噬菌体*Bdellovibrio_phage* (1.3%)等(图5、图6)。

2.3 阿旺绵羊肠道噬菌体多样性差异

我们对获得的150个样品内的噬菌体及其相关功能信息进行分层抽样调查, 运用ANOSIM分析分层抽样的组间差异情况。结果表明, 基于不同养殖方式在噬菌体科、属、种水平上差异显著(科水平: $R = 0.853, P < 0.01$; 属水平: $R = 0.832, P < 0.01$; 种水平: $R = 0.840, P < 0.01$)。不同养殖方式是导致阿旺绵羊肠道中噬菌体物种群落丰度及其相关功能存在差异的主要因素。

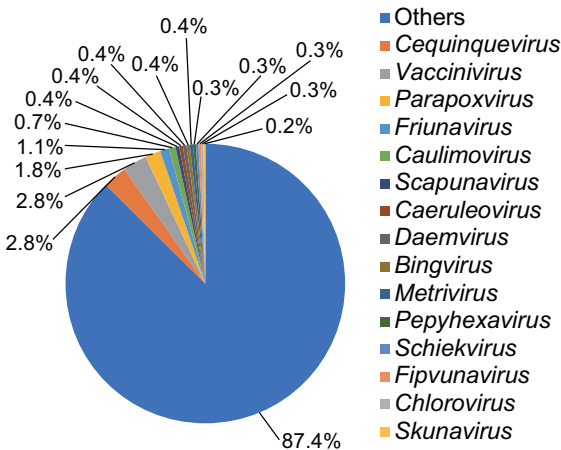


图3 总体肠道噬菌体主要分类属相对丰度。
Fig. 3 The most abundant genus of phage.

在 α 多样性方面, 3个养殖方式噬菌体群落的Chao1指数分别为 503.5 ± 54.0 (fm)、 557.9 ± 40.9 (bs)和 579.3 ± 36.0 (qs), 3个养殖方式噬菌体群落

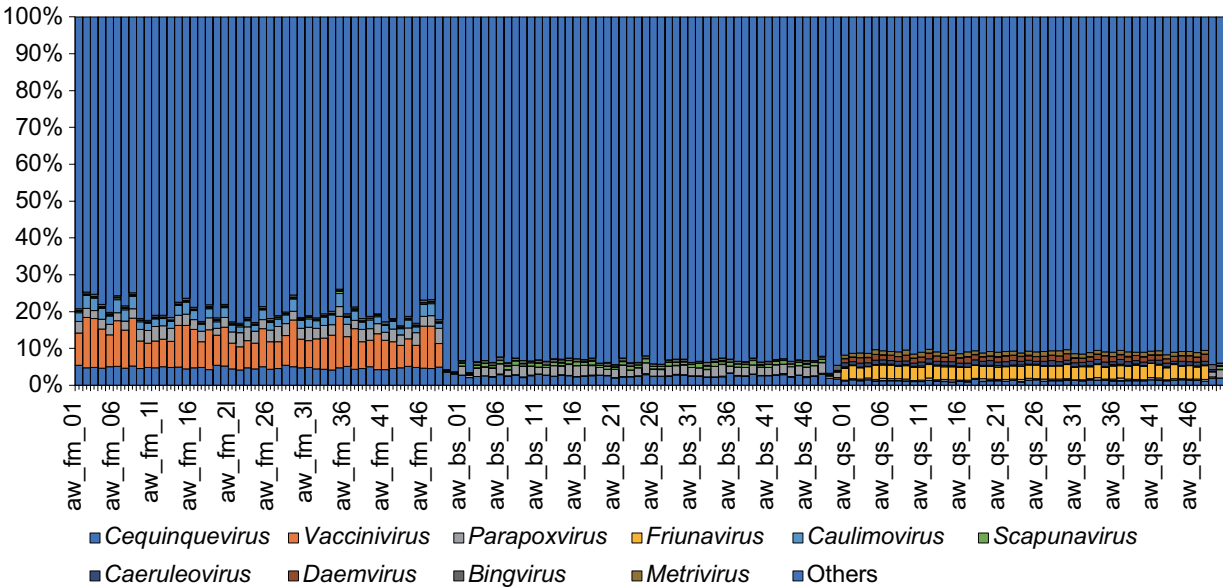


图4 各样品中主要属水平的相对丰度。
Fig. 4 The most abundant genus of phage in each sample.

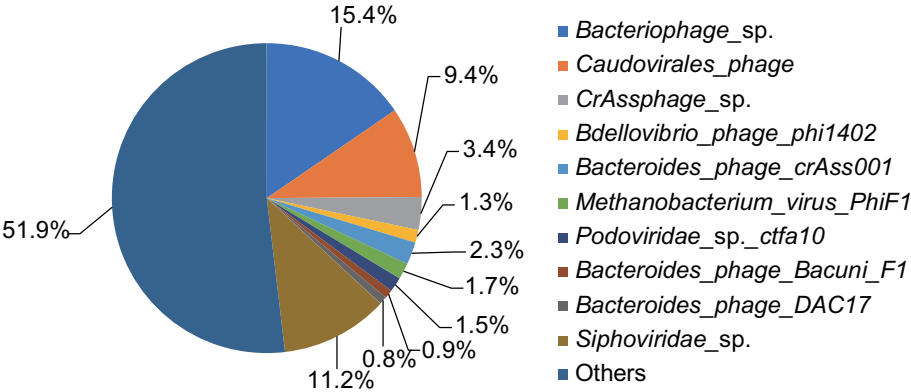


图5 总体肠道噬菌体主要分类种相对丰度。
Fig. 5 The most abundant species of phage.

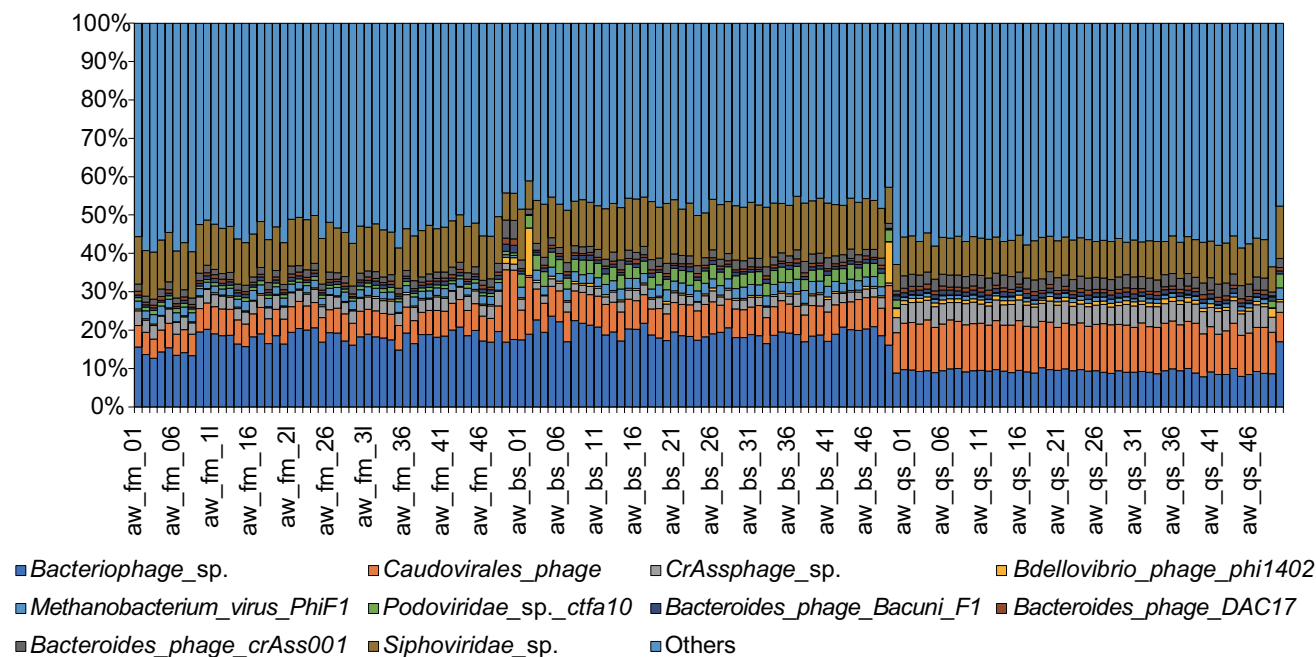


图6 各样品中主要种水平的相对丰度。

Fig. 6 The most abundant genus of phage.

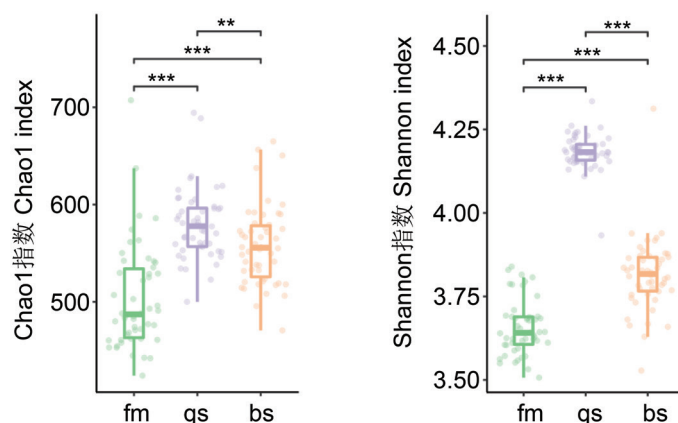


图7 各养殖方式绵羊肠道噬菌体群落的Chao 1和Shannon指数. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 7 Chao 1 and Shannon indices of phage communities for each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

的Shannon指数分别为 3.65 ± 0.08 (fm)、 3.81 ± 0.11 (bs)和 4.18 ± 0.05 (qs). 由图7可见, 各养殖方式之间的Chao1和Shannon指数差异显著.

在科水平上, 3个养殖方式主要拥有26个噬菌体分类科(图8), 主要为长尾病毒科、短尾噬菌体科和肌尾噬菌体科等, 在科水平上三者差异的物种不多(图9).

在属水平上, 3个养殖方式拥有178个共同的噬菌体分类属(图10)主要为塞昆克病毒属、痘苗病毒属、副痘病毒属和布鲁纳病毒属等(图11). 此外, fm养殖方式独有6个属(包括*Plaisancevirus*、*Baxtervirus*、*Twortvirus*和*Myunavirus*等), bs养殖方式独有2

个属(包括*Votkovvirus*和*Majavirus*), qs养殖方式独有3个属(包括*Teseptimavirus*、*Gorganvirus*和*Decapodiridovirus*).

在种水平上, 3个养殖方式拥有762个共同的噬菌体分类种(图12), 主要为克拉斯噬菌体、有尾噬菌体和蛭弧菌噬菌体等(图13), 这些也是所有样品中的优势种. 此外, fm养殖方式独有35个种(包括*Bacillus_phage_Aurora*、*Vibrio_phage_V039C*、*Lactococcus_phage_phage_PhiE1127*、*Lactococcus_phage_P092*、*Mycobacterium_phage_Reptar3000*、*Geobacillus_phage_GBK1*和*Bacillus_phage_MG-B1*等), bs养殖方式独有

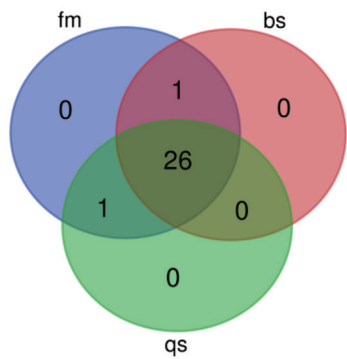


图8 各养殖方式噬菌体科水平Venn图. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 8 Venn plots of phage family for each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

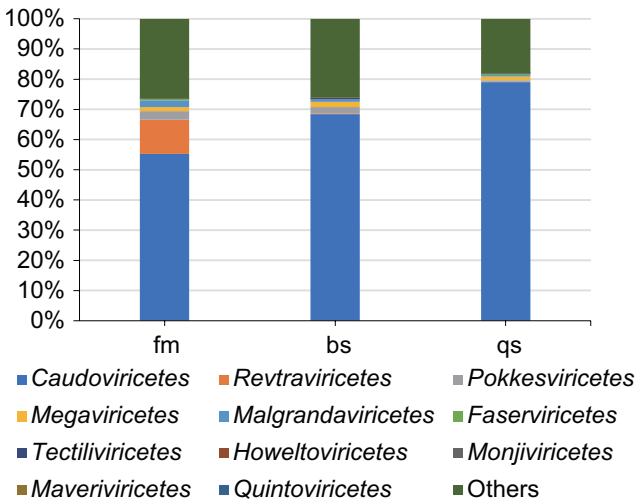


图9 各养殖方式噬菌体主要科水平相对丰度. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 9 The most abundant family of phage in each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

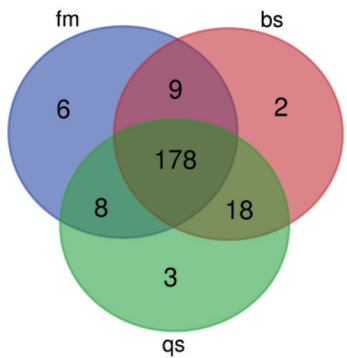


图10 各养殖方式噬菌体属水平Venn图. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 10 Venn plots of phage genus for each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

20个种 (包括 *Staphylococcus_phage_StB20*、*Mycobacterium_virus_Sirduracell*、*Bacillus_phage_BCP12*、*Enterococcus_phage_EFA-2*、*Pseudomonas_phage_vB_PaeM_USP_25*和 *Lactococcus_phage_LW81*等), qs养殖方式独有17个种 (包括 *Streptococcus_phage_Javan119*、*Vibrio_phage_JA-1*、*Bacillus_phage_pW4*、*Lactococcus_phage_P078*、*Acinetobacter_phage_vB_AbaP_APK37*和 *Vibrio_phage_qdvp001*等).

使用 β 多样性指数计算各养殖方式之间噬菌体的群落结构,以加权UniFrac距离计算,PCoA分析 (图14)发现,在各分类水平上 (纲、科、属、种)各养殖方式之间的噬菌体群落结构存在明显差异 ($r > 0$, $P < 0.001$).

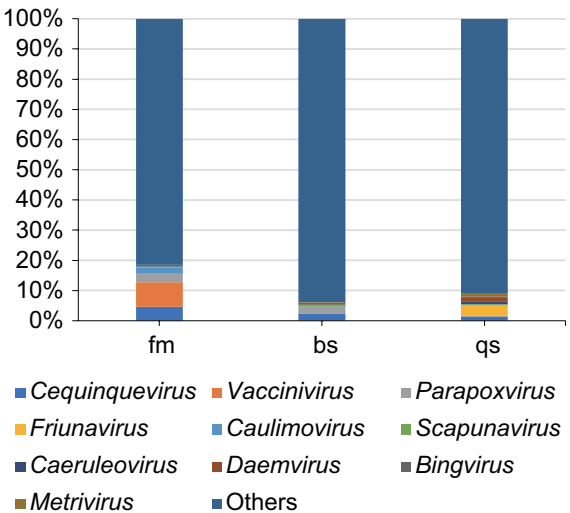


图11 各养殖方式噬菌体主要属水平相对丰度. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 11 The most abundant genus of phage in each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

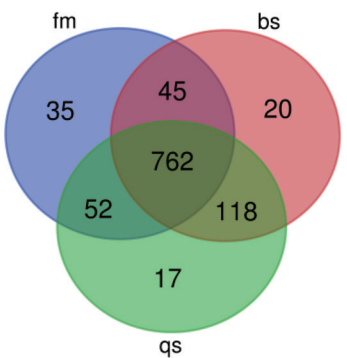


图12 各养殖方式噬菌体种水平Venn图. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 12 Venn plots of phage species for each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

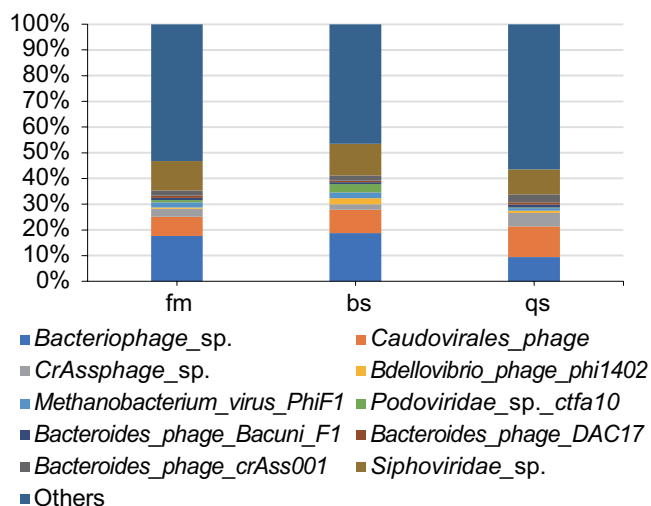


图13 各养殖方式噬菌体主要种水平相对丰度. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 13 The most abundant genus of phage in each breeding model. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

通过LefSE图分析3个养殖方式存在显著差异的分类单元, 分析发现3个养殖方式在多个分类水平上存在差异, 在fm养殖方式中, 与其他两个养殖方式存在极显著差异的物种为 $[\log_{10}(\text{LDA score}) > 4]$ *f__Siphoviridae*; 在bs养殖方式中, 与其他两个养殖方式存在极显著差异的物种为: *c__Caudoviricetes*、*p__Uroviricota*、*o__Caudovirales*的 $\log_{10}(\text{LDA score})$ 大于5, *f__Myoviridae*、*f__Autographiviridae*、*f__Podoviridae*、*g__Friunavirus*、*f__Herelleviridae*的 $\log_{10}(\text{LDA score})$ 大于4; 在qs养殖方式中, 与其他两个养殖方式存在极显著差异的物种为*o__Ortervirales*、*p__Artverviricota*、*c__Revtraviricetes*、*f__Caulimoviridae*、*g__Cequiquevirus*、*g__Vaccinivirus*、*o__Chitovirales* $[\log_{10}(\text{LDA score}) > 4]$ (图15).

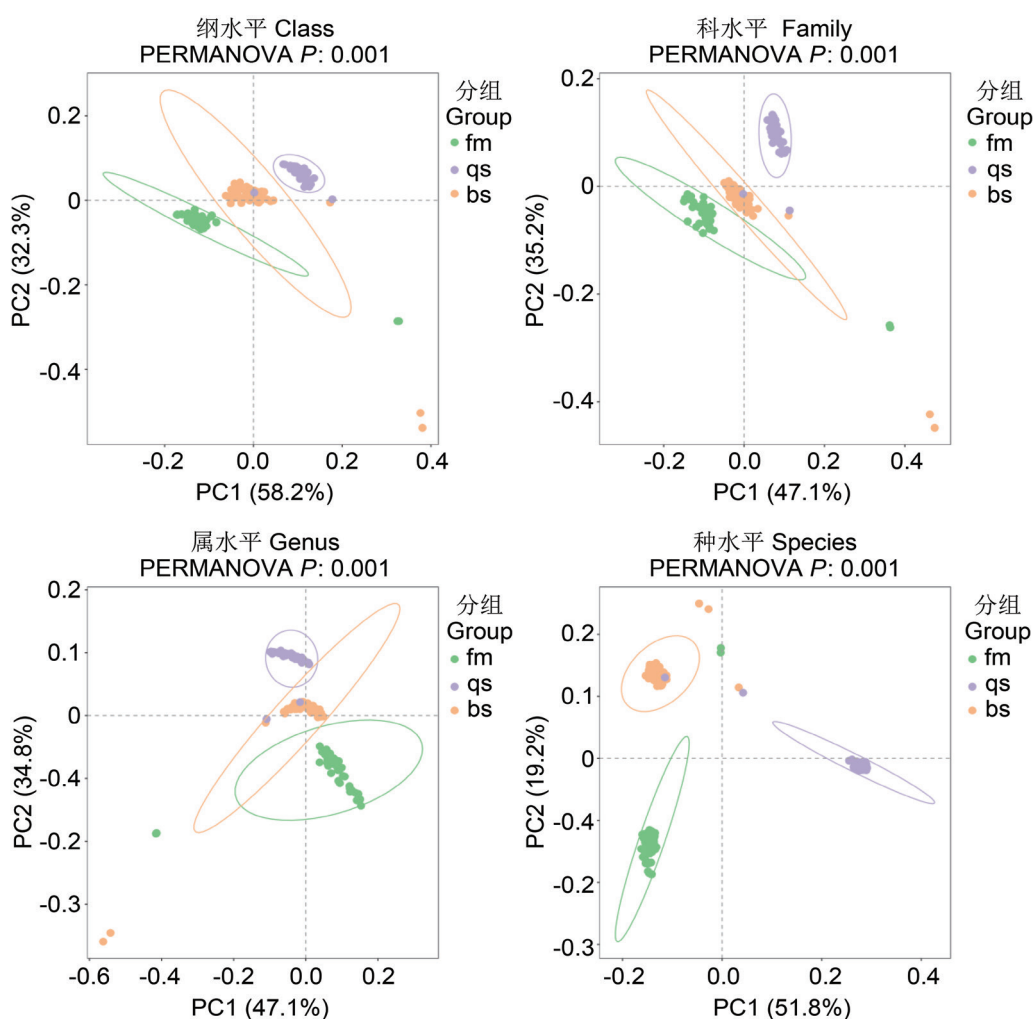


图14 PCoA (principle coordinates analysis) 主坐标分析展示了各分组间的差异. fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式.

Fig. 14 PCoA (principle coordinates analysis) exhibiting the discrepancy of gut phage composition among all the feeding models. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

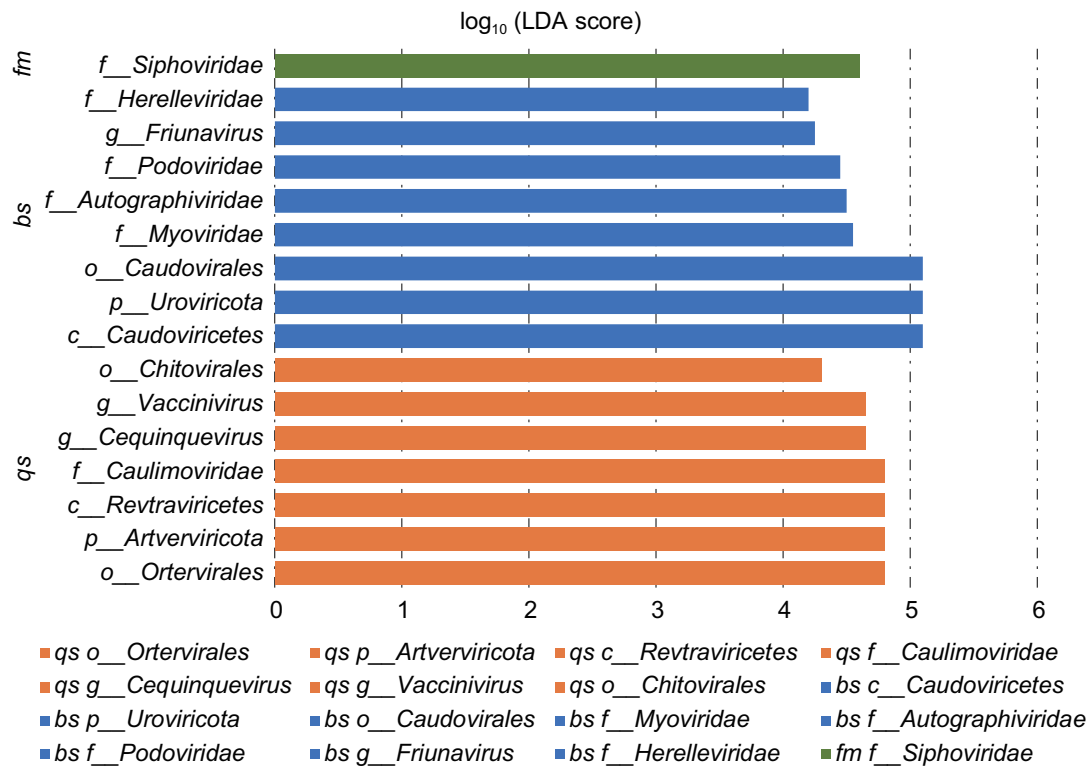


图15 3种养殖方式之间阿旺绵羊噬菌体差异显著的分类单元。fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式。
Fig. 15 Significant taxa in phages among three breeding models of Awang sheep. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

3 讨论与结论

本研究中，阿旺绵羊肠道中的大多数噬菌体主要来自长尾病毒科、短尾噬菌体科和肌尾噬菌体科。其中，长尾病毒科是一种双股DNA病毒，只会感染细菌，具有长且无收缩性的尾鞘，衣壳为正多面体或扁形。目前该科共有313个种，且隶属于47个属，其中λ、T5噬菌体为代表种^[16]。短尾病毒科是Caudovirales目的一个病毒家族，细菌为主要宿主。目前该科有50个种，分20个属^[17]。肌尾病毒科是尾状病毒目噬菌体家族，该科共有93个种，隶属于30个属。由于大多数肌尾病毒科是裂解性噬菌体，而非温和性噬菌体，一些研究人员已经研究了它们作为治疗人类细菌性疾病的方法^[18]。阿旺绵羊肠道噬菌体中丰度较高的下属分类也都隶属于上述3个优势科，诸如塞昆克病毒属、痘苗病毒属和副痘病毒属。目前关于几个优势属的研究资料较少，所知道的是塞昆克病毒属是Caudoviricetes类（具有头尾形态的细菌和古菌病毒）的dsDNA病毒属（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/1912760/>）。在种水平上具体注释出来且相对丰度大于1%的噬菌体为数不多，主要为有尾噬菌体、克拉斯噬菌体、Bacteroides_phage和蛭弧菌噬菌体。尽管本研究将噬菌体的种群注释到

了种水平，由于测序深度的影响及测序水平的受限，本研究中超过50%的噬菌体未被注释出来，有望通过后续的三代宏基因组测序进行进一步的注释。此外，目前尚无有关绵羊肠道噬菌体多样性的研究，因此在绵羊噬菌体群落结构方面暂无法开展相关的横向对比。另有研究表明，噬菌体与细菌之间存在寄生关系，对应的菌群可为对应的噬菌体提供良好的寄生条件，噬菌体也反作用于肠道菌群结构^[19]，如噬菌体从某种程度上能够溶解细菌细胞^[20]，可以控制细菌数量并影响细菌多样性和新陈代谢^[16]。目前可以确定的是，长尾病毒科的宿主多为常见的病原菌，如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌^[21]。然而，作者前期分析阿旺绵羊肠道菌群结构发现，在属水平上菌群主要以罗姆布茨菌属Romboutsia、不动杆菌属Acinetobacter、瘤胃球菌属Ruminococcus、拟杆菌属Bacteroides、尿杆菌属Turicibacter、优杆菌属Eubacterium和梭菌属Clostridium等为主（图16），并未注释到大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌等病原菌。因此，具体噬菌体和具体菌属之间的寄生关联还有待进一步核实。

本研究进行了分层抽样调查和ANOSIM差异显著分析，发现不同养殖方式之间阿旺绵羊肠道噬菌体群落结构存在显著差异，结合PCoA分析也发现各养殖

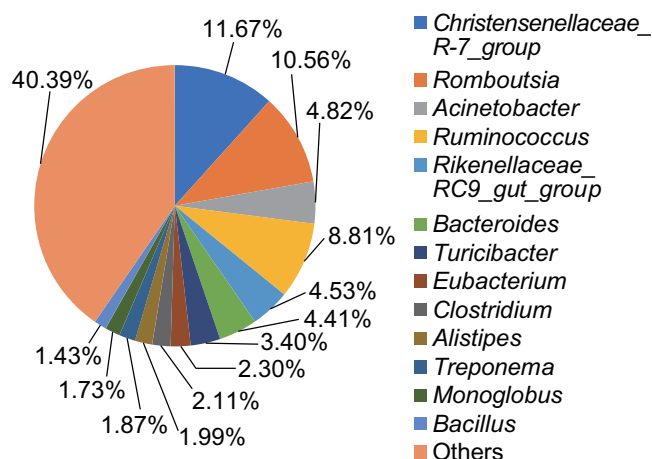


图16 阿旺绵羊总体肠道细菌主要分类属相对丰度。

Fig. 16 The most abundant genus of intestinal bacteria of Awang sheep.

方式间噬菌体群落数据聚类较好。也就是说, 养殖方式的不同成为主导阿旺绵羊肠道噬菌体产生差异的重要因素, 而在组间差异方面年龄和性别似乎没有产生重要影响。值得一提的是, 在先前有关大熊猫肠道噬菌体多样性的研究中也发现, 不同饲养基地宿主肠道噬菌体群落结构的差异较为显著^[22]。同样地, 在 α 多样性指数方面, 不同养殖方式的Chao1与Shannon指数存在着显著差异, 从放牧到半舍饲再到全舍饲, Chao1和Shannon指数都在不断升高。据记录, 不同

养殖方式之间绵羊的饲喂食物有一定的区别, 放牧养殖方式的绵羊以高原草甸为食, 半舍饲养殖方式的绵羊除高原草甸外还会饲喂一定的青干草和芨根, 而进入全舍饲后则以饲喂颗粒饲料为主。毫无疑问, 饮食结构的不同对肠道微生物的群落变化起着主导作用^[23], 由于肠道菌群受到了影响形成差异, 从而可能使肠道菌的寄生物噬菌体的群落结构及其功能产生差异^[24]。然而, 不同养殖方式之间, 除饮食和地理因素外, 诸如气候、海拔、温度、湿度、降水等也是可能为导致该差异产生的重要介导因子。然而, 本研究缺乏对采样地点湿度、温度、水质和气候等环境因子的采集, 因此, 具体的环境影响因素及其相关机制有待进一步研究。通过LefSE分析进一步挖掘各养殖方式之间的差异物种发现, 大部分差异出现在了一些比较冷门的分类单元, 然而都缺乏详细的生物学特征资料, 且具有显著差异的噬菌体分类单元大部分并非阿旺绵羊肠道内的优势噬菌体分类单元。值得注意的是, 在放牧养殖方式中, 发现了与其他两个养殖方式存在极显著差异的分类单元长尾病毒科 $[\log_{10}(\text{LDA score}) > 4]$ 。然而, 该病毒科下所包含的噬菌体分类较多, 无法进行更具体的定性分析。此外, 结合前期在不同养殖模式阿旺绵羊肠道菌差异物种分析, 并未发现差异菌体与噬菌体存在的明显关联(图17)。

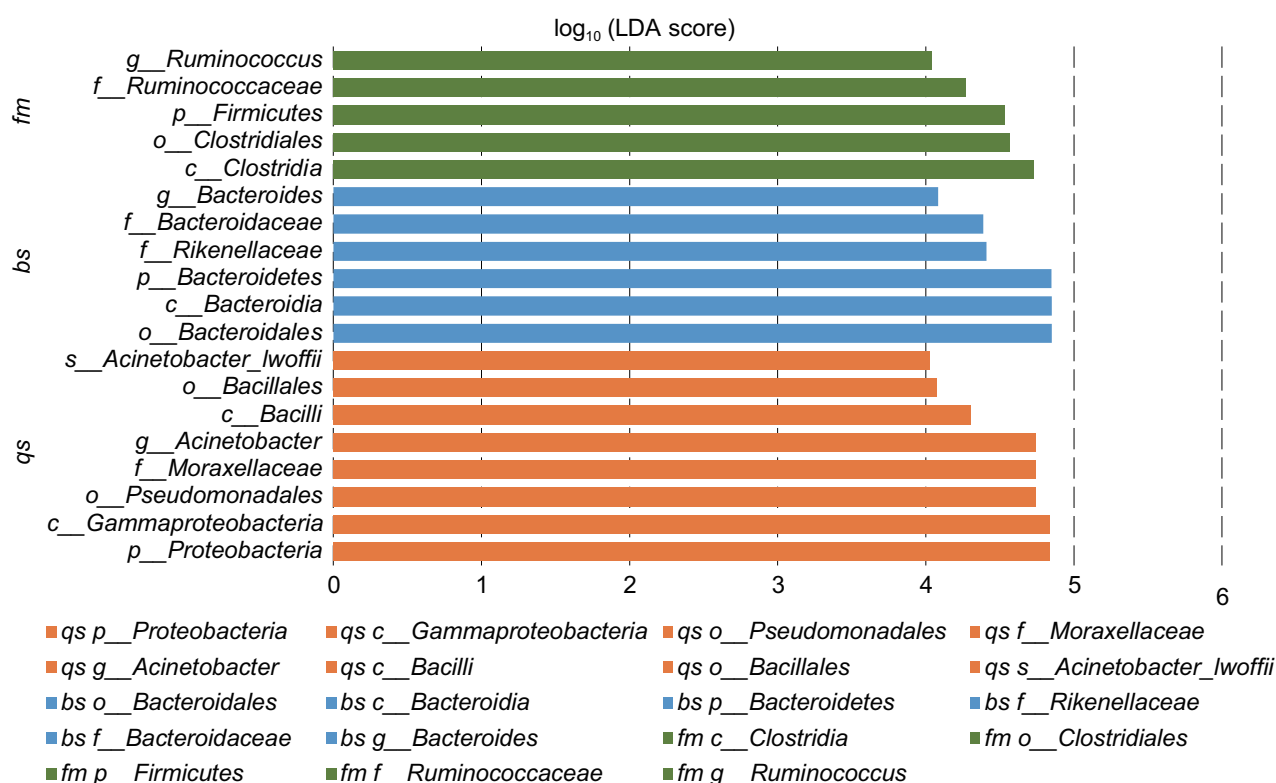


图17 3种养殖方式之间阿旺绵羊肠道细菌差异显著的分类单元。fm、bs和qs分别代表放牧、半舍饲和全舍饲3个不同饲养方式。

Fig. 17 Significant taxa in intestinal bacteria among three breeding models of Awang sheep. fm, bs, and qs represent grazing, semi-house feeding, and full house feeding, respectively.

总之,本研究利用宏基因组学方法对阿旺绵羊肠道噬菌体进行了全面探究,共注释到1 050种噬菌体,主要分布于长尾病毒科、短尾噬菌体科和肌尾噬菌体科。研究还发现,不同养殖方式之间噬菌体群落结构

存在显著差异,且 α 多样性指数也存在明显差异。本研究扩展了对阿旺绵羊肠道噬菌体的群落结构的认知,有助于挖掘阿旺绵羊肠道噬菌体在疾病防控及治疗的潜力,为保障阿旺绵羊的肠道健康提供新的思路。

参考文献 [References]

- 1 Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. *Science*, 2008, **320** (5883): 1647-1651
- 2 Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, **13** (5): 321-335
- 3 Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut [J]. *PNAS*, 2013, **110** (50): 20236-20241
- 4 Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, Stappenbeck TS, McGovern DPB, Keshavarzian A, Mutlu EA, Sauk J, Gevers D, Xavier RJ, Wang D, Parkes M, Virgin HW. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease [J]. *Cell*, 2015, **160** (3): 447-460
- 5 Manrique P, Bolduc B, Walk ST, Van Der Oost J, De Vos WM, Young MJ. Healthy human gut phageome [J]. *PNAS*, 2016, **113** (37): 10400-10405
- 6 王富强, 杨孝朴. 青藏高原阿旺绵羊线粒体基因组研究[J]. 中国草食动物科学, 2016, **36** (1): 1-4 [Wang FQ, Yang XP. Study and analysis on complete mitochondrial genome sequence of awang sheep of the Qinghai-Xizang Plateau [J]. *Chin Herb Sci*, 2016, **36** (1): 1-4]
- 7 Guo W, Mishra S, Zhao JC, Tang JS, Zeng B, Kong FL, Ning RH, Li M, Zhang HZ, Zeng YT, Tian YLZ, Zhong YH, Luo HD, Liu YH, Yang JD, Yang MY, Zhang MW, Li Y, Ni QY, Li CW, Wang CD, Li DS, Zhang HM, Zuo ZL, Li Y. Metagenomic study suggests that the gut microbiota of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) may not be specialized for fiber fermentation [J]. *Front Microbiol*, 2018, **9**: 229
- 8 Yang SZ, Gao X, Meng JH, Zhang AY, Zhou YM, Long M, Li B, Deng WW, Jin L, Zhao SY, Wu DF, He YG, Li CW, Liu SL, Huang Y, Zhang HM, Zou LK. Metagenomic analysis of bacteria, fungi, bacteriophages, and helminths in the gut of giant pandas [J]. *Front Microbiol*, 2018, **9**: 1717
- 9 Liu N, Li HJ, Chevette MG, Zhang L, Cao L, Zhou HK, Zhou XG, Zhou ZH, Pope PB, Currie CR, Huang YP, Wang Q. Functional metagenomics reveals abundant polysaccharide-degrading gene clusters and cellobiose utilization pathways within gut microbiota of a wood-feeding higher termite [J]. *ISME J*, 2019, **13** (1): 104-117
- 10 Vital M, Howe A, Bergeron N, Krauss RM, Jansson JK, Tiedje JM. Metagenomic insights into the degradation of resistant starch by human gut microbiota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, **84** (23): e01562
- 11 Zhang X, Chen YH, Zhu JY, Zhang M, Ho CT, Huang QR, Cao JX. Metagenomics analysis of gut microbiota in a high fat diet-induced obesity mouse model fed with (-)-epigallocatechin 3-(3-methyl) gallate (EGCG3Me) [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, **62** (13): e1800274
- 12 Yinda CK, Vanhulle E, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Shi CY, Ghogomu SM, Maes P, Van Ranst M, Matthijnssens J. Gut virome analysis of cameroonians reveals high diversity of enteric viruses, including potential interspecies transmitted viruses [J]. *Mosphere*, 2019, **4** (1): e00585
- 13 Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N, Zaharia M, Lee D, Samayoa E, Bouquet J, Greninger AL, Luk KC, Enge B, Wadford DA, Messenger SL, Genrich GL, Pellegrino K, Grard G, Leroy E, Schneider BS, Fair JN, Martinez MA, Isa P, Crump JA, Derisi JL, Sittler T, Hackett J, Miller S, Chiu CY. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples [J]. *Genom Res*, 2014, **24** (7): 1180-1192
- 14 Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution [J]. *Res Microbiol*, 2003, **154** (4): 245-251
- 15 Bondy-Denomy J, Davidson AR. When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness [J]. *J Microbiol*, 2014, **52** (3): 235-242
- 16 Lusiak-Szelachowska M, Weber-Dabrowska B, Jonczyk-Matysiak E, Wojciechowska R, Górski A. Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications [J]. *Gut Pathog*, 2017, **9**: 44
- 17 Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice [J]. *Antimicrobiol*

- Agents Chemother*, 2007, **51** (8): 2765-2773
- 18 Brown K, Olendraite I, Valles SM, Firth AE, Chen Y, Guerin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, De Miranda JR, Ryabov E, Ictv Report C. ICTV virus taxonomy profile: solinviviridae [J]. *J Gen Virol*, 2019, **100** (5): 736-737
- 19 Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota [J]. *Gut Microbes*, 2013, **4** (1): 4-16
- 20 Brown-Jaque M, Muniesa M, Navarro F. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools [J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, **6**: 33000
- 21 Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Alfenas-Zerbini P, Davison AJ, Dempsey DM, Dutilh BE, Garcia ML, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, Junglen S, Knowles NJ, Krupovic M, Kuhn JH, Lambert AJ, Lobočka M, Nibert ML, Oksanen HM, Orton RJ, Robertson DL, Rubino L, Sabanadzovic S, Simmonds P, Smith DB, Suzuki N, Van Dooerslaer K, Vandamme AM, Varsani A, Zerbini FM. Changes to virus taxonomy and to the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses (2021) [J]. *Arch Virol*, 2021, **166** (9): 2633-2648
- 22 赵思越, 李才武, 杨盛智, 李果, 何永果, 吴代福, 黄炎, 张和民, 邹立扣. 大熊猫肠道噬菌体的多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2020, **26** (3): 489-498 [Zhao SY, Li CW, Yang SZ, Li G, He YG, Wu DF, Huang Y, Zhang HM, Zou LK. Diversity of intestinal phages in giant panda [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, **26** (3): 489-498]
- 23 Kivistik C, Tammert H, Kisand V, Kairo K, Herlemann DPR. Impact of disturbance and dietary shift on gastrointestinal bacterial community and its invertebrate host system [J]. *Mol Ecol*, 2023, **32** (23): 6631-6643
- 24 Molina F, Simancas A, Tabla R, Gomez A, Roa I, Rebollo JE. Diversity and local coadaptation of *Escherichia coli* and coliphages from small ruminants [J]. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 564522