

野化培训与放归、野生大熊猫肠道菌群的组成和变化*

晋蕾^{1#} 周应敏^{2#} 李才武² 吴代福² 李果² 何永果² 李蓓¹ 黄炎² 张和民^{2**} 邹立扣^{1**}

¹四川农业大学资源学院 成都 611130

²中国大熊猫保护研究中心 卧龙 623006

摘要 追踪采集1只亚成年大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 在野化培训 ($N = 4$)、预放归 ($N = 4$) 和放归 ($N = 5$) 过程的粪样以及5个野生大熊猫粪样, 基于高通量测序技术, 研究大熊猫肠道细菌、真菌的组成和变化。结果发现, 亚成年大熊猫肠道内细菌在门水平上以Firmicutes (61.33%) 和Proteobacteria (35.09%) 为主, 在属水平上以*Clostridium* (39.68%)、*Escherichia* (20.94%) 和*Leuconostoc* (8.75%) 为主。真菌在门水平上以Ascomycota (81.56%), 在属水平上以*Humicola* (26.43%)、*Sphaerulina* (12.42%) 和*Aspergillus* (4.49%) 为主。预放归大熊猫肠道细菌菌群的组成和放归大熊猫相似, 但真菌菌群存在差异。随着培训—放归—野外的过程变化, 细菌菌群丰富度和多样性差异不显著 ($P > 0.05$), 其中Chao-1指数呈上升趋势, 而Shannon指数呈下降趋势。野外和培训大熊猫肠道真菌菌群的丰富度差异显著 ($P < 0.05$), Chao-1和Shannon指数均呈上升趋势。同时发现, 在细菌菌群中*Leuconostoc*的比例持续上升, 而*Acinetobacter*和*Zea*比例持续下降。真菌菌群中*Stachybotrys*、*Fusarium*、*Retroconis*和*Debaryomyces*的比例持续上升, *Cryptococcus* 和*Lulwoayna*比例持续下降。*Clostridium*、*Bacillus*、*Sphaerulina*和*Aspergillus*在放归过程中比例最高。本研究结果表明预放归过程肠道菌群不稳定, 且真菌菌群的变化较明显, 建议放归过程中缩短预放归时间; 总体而言, 野化培训与放归大熊猫肠道菌群的多样性、丰富度和结构组成逐渐向野生大熊猫趋近, 野化培训与放归有利于大熊猫肠道菌群的重建, 提高放归大熊猫的存活率。(图6 表2 参37)

关键词 培训; 预放归; 放归; 野外; 大熊猫; 肠道菌群

CLC Q959.838 : Q938.1

Composition and variation of gut microbiome of trained, preparatory reintroduced, reintroduced and wild giant pandas*

JIN Lei^{1#}, ZHOU Yingmin^{2#}, LI Caiwu², WU Daifu², LI Guo², HE Yongguo², LI Bei¹, HUANG Yan², ZHANG Heming^{2**} & ZOU Likou^{1**}

¹ College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Wolong 623006, China

Abstract This study aims to investigate the composition and variation of gut bacteria and fungi of juvenile giant pandas (GPs) during different stages: training ($N = 4$), preparatory reintroduction ($N = 4$), and reintroduction ($N = 5$). The samples from the juvenile GPs as well as 5 feces samples from wild GPs were analyzed using high-throughput sequencing technology to investigate the relationship between the gut microbiome and the survival rate of GPs. The results showed that, at phylum level, the bacteria in juvenile giant pandas mainly consisted of Firmicutes (61.33%) and Proteobacteria (35.09%), and the fungi mainly consisted of Ascomycota (81.56%). At genus level, the bacteria mainly consisted of *Clostridium* sp. (39.68%), *Escherichia* sp. (20.94%) and *Leuconostoc* sp. (8.75%), while the fungi mainly consisted of *Humicola* sp. (26.43%), *Sphaerulina* sp. (12.42%) and *Aspergillus* sp. (4.49%). The composition of bacteria in preparatory reintroduced GPs was similar to that of reintroduced GPs, contrarily, the composition of fungal communities was opposite. The richness and diversity of bacteria showed no significant difference between trained, preparatory reintroduced, and wild GPs. Contrarily, the richness of fungi showed significant differences between wild vs. trained, and wild vs. preparatory reintroduced GPs. However, in bacterial communities, the proportion of *Leuconostoc* sp. increased continuously over the four stages, while *Acinetobacter* sp. and *Zea*

收稿日期 Received: 2018-06-05 接受日期 Accepted: 2018-06-27

*中国大熊猫保护研究中心项目 (CCRCGP181918) 和卧龙大熊猫俱乐部项目资助 Supported by the Project of China Conservation and Research Center for the Giant Panda (CCRCGP181918) and the Project of Wolong Panda Club

**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: Wolong_zhm@126.com; zoulikou@sicau.edu.cn)

#共同第一作者 Joint first authors

sp. decreased. In fungal communities, the proportion of *Stachybotrys* sp., *Fusarium* sp., *Retroconis* sp., and *Debaryomyces* sp. displayed a continuous increase, while *Cryptococcus* sp. and *Lulwoayna* sp. decreased over the four stages. Additionally, the proportions of *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Sphaerulina* sp., and *Aspergillus* sp. in reintroduced GPs were larger than those in other groups. The study showed that GPs gut microbiome fluctuated during the preparatory reintroduction stage, especially fungi. Thus, we suggested shorter preparatory reintroduction stage. In general, the richness, diversity, and composition of the gut microbiome in trained and reintroduced GPs gradually approached that of wild GPs. Besides, training and reintroduction can help the GPs reestablish their gut microbiome and improve the survival rate.

Keywords trained; preparatory reintroduction; reintroduction; wild; giant panda; gut microbiome

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国特有的珍稀濒危物种, 国家 I 级保护动物^[1-4]。有研究表明, 建立保护区对大熊猫进行就地保护虽能保护延续其种群, 但该方法无法长久, 而针对大熊猫这类孤立小种群的最长久有效的办法是放归加入新的大熊猫个体^[5], 例如南非的猎豹^[6]、美国黄石公园的灰狼^[7]和中国的普氏野马^[8]均属于孤立小种群, 放归后都能稳定生存并顺利繁衍, 且有望建立延续稳定的种群。因而在解决三难问题后(发情、配种和育幼), 中国保护大熊猫研究中心于2003年7月开启了大熊猫野外放归项目, 旨在将经人工野化培训后的大熊猫放归到自然环境中以补充野外大熊猫数量, 提高野外大熊猫的遗传多样性, 实现大熊猫野外种群的复壮, 最终建立能自我维持的野生种群^[9-10]。该项目的重点在于提高大熊猫在野外的存活率^[9], 纵观国内外放归成功的案例很多, 但仍有部分个体甚至全部个体死亡的案例存在, 因而采取一定技术手段并完善大熊猫放归标准是提高其野外的存活率的关键^[10]。

肠道微生物在维持宿主正常的生理和生化功能中起着重要作用, 当肠道菌群的平衡被打破, 即可能引起各种各样的疾病^[11-12]。大量研究指出, 肠道微生物在大熊猫中也充当重要角色, 除对其营养、代谢和生长发育等有着重要影响外, 肠道疾病致死是导致大熊猫濒危的重要因素之一^[13-14]。因而研究大熊猫肠道菌群对提高放归大熊猫野外的存活率有着重要意义, 目前涉及放归大熊猫的研究报道较多, 但针对其肠道菌群的研究较少, 且其中大部分研究使用的方法都是传统的分离鉴定和16rDNA-RFLP法, 这些方法均存在局限性, 不能完全反映大熊猫肠道中微生物的情况^[12, 15]。此外, 这些研究大部分都选择圈养大熊猫作为对照组进行肠道微生物组成的对比^[9], 但现有研究表明大型兽类的圈养个体直接放归野外的成功率极低^[16], 且在大熊猫中也有圈养大熊猫放归后因无法融入野外大熊猫种群而死亡的实例^[17], 因而为提高放归大熊猫的存活率使其能融入野外大熊猫种群, 现阶段放归的大熊猫都是预先经过野化培训的, 而非直接放归^[18], 由此可见, 这些研究结果的时效性较低, 已不适用于现阶段大熊猫的放归工作。因此, 我们选择培训、预放归、放归和野外的大熊猫, 利用高通量测序技术对其肠道微生物菌群的组成和变化进行研究, 为放归大熊猫的选择提供基础数据, 为大熊猫野化培训方法提供技术支撑, 并为预放归大熊猫的转运和准备工作提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在四川卧龙中国大熊猫自然保护研究中心, 追踪采集一只放归大熊猫从野化培训到放归全过程的新鲜粪便样品共13个, 其中野化培训样品4个(A1), 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品4个(A2), 放归样品5个(A3), 采样大熊猫身体属于健康状态。同时, 采集到5个野外大熊猫粪便样品(A4)。采样过程中使用无菌一次性手套, 采集粘液明显的新鲜的整块粪便于无菌袋, 并储存于冰盒, 24 h内送回实验室, 在无菌条件下, 将粪便外部剥离, 取中间粪便进行分装, 并于-70℃保存备用。

1.2 粪便中细菌真菌DNA的提取

准确称取50 g粪便样品于离心管中, 并加入无菌磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)反复搅拌清洗, 离心后用Mobio Power Fecal DNA Isolation Kit试剂盒抽提样本中细菌DNA, 用Omega Fungal DNA Kit试剂盒提取真菌DNA。

1.3 PCR扩增

针对样品中细菌的16S rRNA V4区和真菌的ITS1区, 分别选用引物(520 F-5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3', 802R-5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'; ITS1-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS2-5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT GC-3')进行扩增^[19]。

1.4 高通量测序

将检测合格的细菌和真菌DNA送于上海派森诺生物科技有限公司并采用Illumina Miseq测序平台进行高通量测序。

1.5 数据分析和处理

首先运用Mothur软件中Uchime的方法去除测序所得原始序列中的嵌合体序列, 并根据序列的重叠关系进行拼接^[20-21]。接着用QIIME软件对拼接后的序列进行过滤:(1)去除5'端引物错配碱基数大于1的序列;(2)去除含有模糊碱基的序列;(3)去除含有连续相同碱基数大于8的序列;(4)去除长度小于等于150 bp的序列;去除嵌合体序列, 将过滤得到的序列与NCBI数据库进行比对并去除其中的嵌合体, 以得到有效序列^[22]。然后使用QIIME软件中的Uclust方法, 根据97%相似性水平, 将有效序列聚类成分类操作单元(Operational taxonomic units, OTU)^[21]。最后, 用R软件计算Chao-1(The Chao1 estimator)和Shannon(The Shannon estimator)指数分析各组群落丰富度和多样性的差异, 并绘制NMDS(Non-Metric Multi-Dimensional Scaling)对构成各组的微生物菌群进行聚类分析。

2 结果

2.1 大熊猫肠道细菌菌群的组成和变化

2.1.1 亚成年大熊猫肠道细菌菌群的组成 本试验共获得61 810条细菌的有效序，按97%的相似度聚类后得到9 873个OTU，经物种注释后共获得18门30纲48目100科191属。在门分类水平，Firmicutes (61.33%) 和Proteobacteria (35.09%) 是组成亚成年大熊猫肠道细菌菌群的两大主要门，不包含未注释门(图1A)。在属分类水平，取相对丰度前20的细菌作图(图1B)，其中相对丰度大于1%的细菌共有12种，前5位为Clostridium (39.68%)、Escherichia (20.94%)、Leuconostoc (8.75%)、Pseudomonas (5.08%) 和Epulopiscium (4.69%)，不包含未注释属。

2.1.2 培训、预放归、放归和野外大熊猫肠道细菌菌群的组成和变化 首先，通过Chao-1和Shannon指数研究各组大熊猫肠道细菌菌群丰富度和多样性的变化，结果如图2所示，A4具有最高的Chao-1和最低的Shannon指数值(330.16和1.96)，A1和A2分别具有最高的Shannon和最低的Chao-1指数值(2.63和249.13)。同时各组间丰富度和多样性不存在显著性差异($P > 0.05$, t -test)。总体来看，Chao-1指数先呈下降趋势，然后自A2到A4持续上升，而Shannon指数这自A1到A4持续下降。

其次，利用NMDS对各组大熊猫肠道细菌菌群进行聚

类分析，结果如图3所示，可见A2和A3组聚集在一起，而A1和A4组都独立聚集，表明A2和A3大熊猫肠道细菌菌群的组成较相似，A1和A4与其余各组大熊猫肠道细菌菌群组成的相似较低。最后结合图1对前20的属在各阶段的具体变化情况进行分析，发现Leuconostoc的相对丰度在A1-A4中呈持续上升，而Acinetobacter则持续下降(不含未识别属)(表1)。此外，还发现Clostridium和Bacillus在A3中的丰度高于其余两组，而Escherichia、Streptococcus和Lactococcus的相对丰度则呈相反的结果(表1)。

表1 组间发生变化的大熊猫肠道细菌菌群
Table 1 Differences of the bacterial communities in giant pandas (GPs) gut microbiome among different groups

属 Genus	A1	A2	A3	A4
Leuconostoc	0.34%	3.14%	12.30%	29.25%
Acinetobacter	3.14%	1.23%	0.46%	0.02%
Clostridium	23.73%	34.95%	59.82%	20.44%
Bacillus	0.03%	0.01%	0.06%	0.01%
Escherichia	14.94%	37.24%	3.24%	31.10%
Streptococcus	1.85%	0.30%	0.26%	6.32%
Lactococcus	3.55%	0.78%	0.03%	2.96%

A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

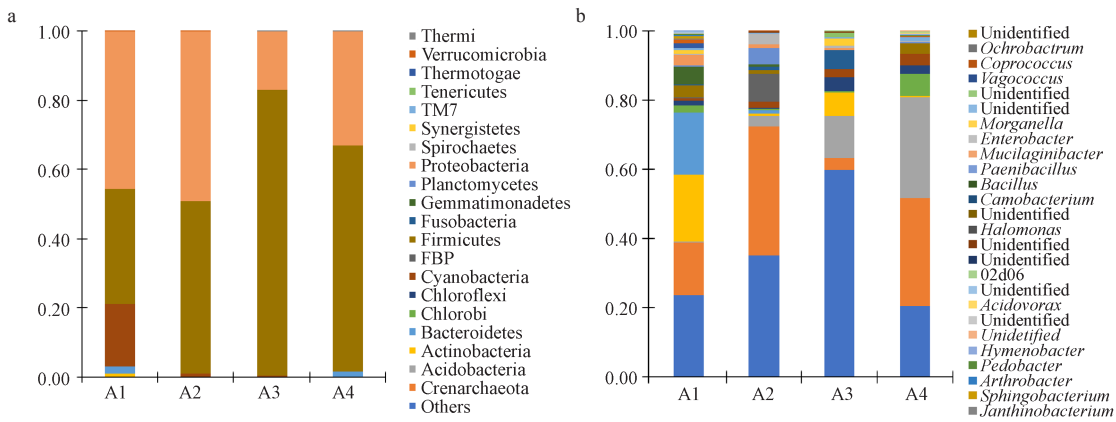


图1 大熊猫肠道细菌菌群的组成。a: 门分类水平; b: 属分类水平。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

Fig. 1 Composition of the bacteria in giant pandas (GPs) gut microbiome. a: At phylum level. b: At genus level. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

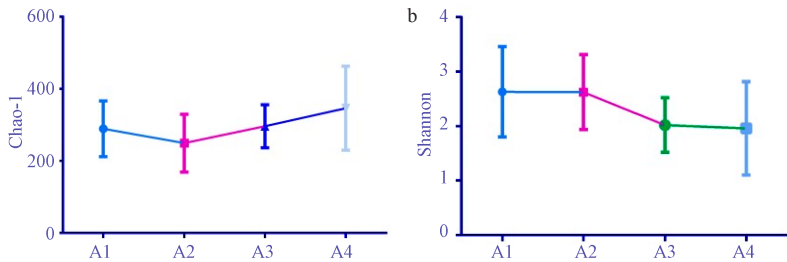


图2 大熊猫肠道细菌菌群丰富度(a)和多样性(b)。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

Fig. 2 Richness (a) and diversity (b) of the bacteria in giant pandas (GPs) gut microbiome. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

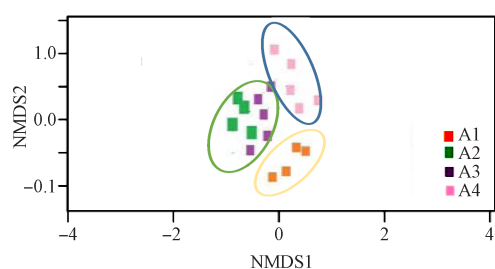


图3 各组大熊猫肠道细菌菌群的NMDS图。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

Fig. 3 The NMDS of the bacterial communities in giant pandas (GPs) gut microbiome. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

2.2 培训、预放归、放归和野外大熊猫肠道真菌菌群的组成和变化

2.2.1 亚成年大熊猫肠道真菌菌群的组成 按97%的相似度聚类后得到6 897个真菌OTU, 注释后得到11门30纲48目100科383属。在门分类水平, Ascomycota (81.56%) 是组成大熊猫肠道真菌菌群的主要门, 不包含未注释门(图4A)。在属分类水平, 取相对丰度前20的细菌做图(图4B), 其中相对

丰度大于1%的细菌共有12种, 前4位为*Humicola* (26.43%)、*Sphaerulina* (12.42%)、*Aspergillus* (4.49%)、*Stachybotrys* (3.17%) 和*Gibellulopsis* (3.06%), 不包含未注释属。

2.2.2 培训、预放归、放归和野外大熊猫肠道真菌菌群的组成和变化 各组大熊猫肠道内真菌菌群的Chao-1和Shannon指数如图5所示, A4具有最高的Chao-1和Shannon指数值(345.6和3.74), 而A1具有最低的Chao-1和Shannon指数值(166.75和2.37)。同时A4与A1和A2在Chao-1指数上具有显著性差异($P < 0.05$, t -test)。整体来看从A1到A4, Chao-1指数呈持续上升趋势, 而Shannon指数则呈上下波动的情况。

各组大熊猫肠道真菌菌群的NMDS分析图如图6所示, 可见A3和A4组聚集在一起, 而A1和A2组均独自聚集, 表明A3和A4组的大熊猫肠道真菌菌群的组成较相似而A1和A2与其余各组肠道菌群组成相似度较低。然后结合图1所示, 发现*Stachybotrys*、*Fusarium*、*Retroconis*和*Debaryomyces*的相对丰度自A1到A4呈持续上升, 而*Cryptococcus*和*Lulwoana*则持续下降(表2)。此外, *Sphaerulina*和*Aspergillus*在A3中的相对丰度都高于其他组(表2)。

3 讨论

熊焰等^[23]和谭志等^[9]采用传统分离鉴定法对卧龙自然保

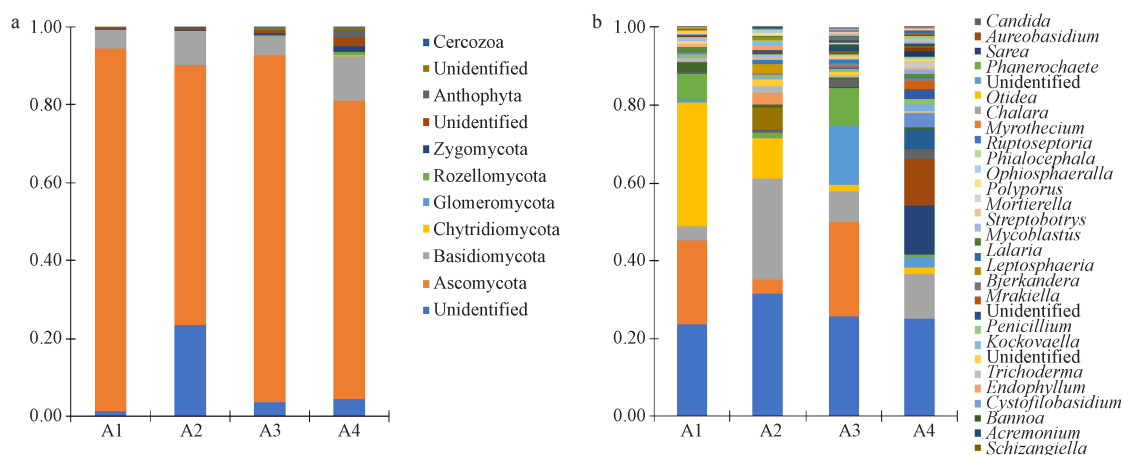


图4 大熊猫肠道真菌菌群的组成。a: 门分类水平; b: 属分类水平。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

Fig. 4 Composition of the fungi in great pandas (GPs) gut microbiome. a: At phylum level. b: At genus level. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

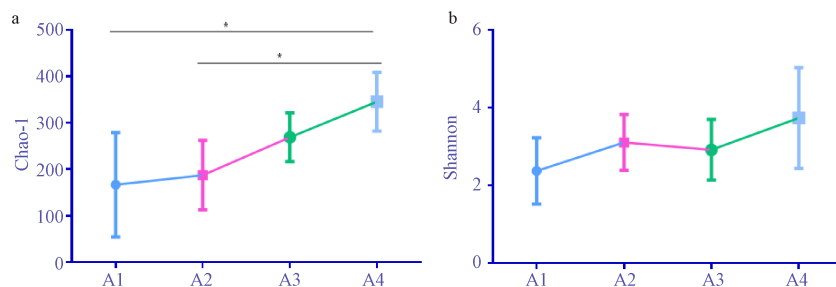


图5 大熊猫肠道真菌菌群多样性(a)和丰富度(b)。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。

Fig. 5 Richness (a) and diversity (b) of the fungi in great pandas (GPs) gut microbiome. a: At phylum level. b: At genus level. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs. * $P < 0.05$.

表2 组间发生变化的大熊猫肠道真菌菌群
Table 2 Differences of the fungal communities in great panda gut microbiome among different groups

属 Genus	A1	A2	A3	A4
<i>Stachybotrys</i>	0.00%	0.00%	0.12%	12.57%
<i>Fusarium</i>	0.48%	1.04%	1.95%	2.47%
<i>Retroconis</i>	0.00%	0.00%	0.01%	4.87%
<i>Debaryomyces</i>	0.01%	0.15%	0.16%	2.34%
<i>Cryptococcus</i>	2.31%	0.76%	0.57%	0.55%
<i>Lulwoana</i>	1.08%	0.41%	0.00%	0.00%
<i>Sphaerulina</i>	21.55%	3.70%	24.32%	0.10%
<i>Aspergillus</i>	6.85%	1.04%	9.53%	0.52%

A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。
a: At phylum level. b: At genus level. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

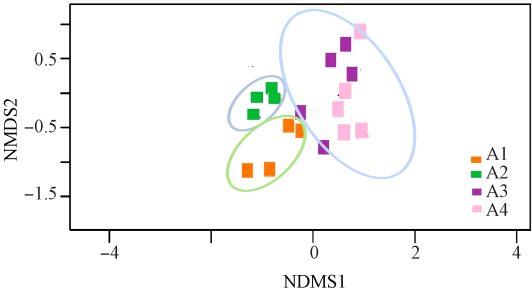


图6 各组大熊猫肠道真菌菌群的NMDS图。A1: 野化培训样品; A2: 从抓捕到放归前(文中称为预放归)样品; A3: 放归样品; A4: 野外大熊猫粪便样品。
Fig. 6 The NMDS of the fungal communities in great panda gut microbiome. a: At phylum level. b: At genus level. A1: The samples from the GP at training stage; A2: The samples from the GP at preparatory reintroduction stage; A3: The samples from the GP at reintroduction stage; A4: The samples from wild GPs.

护区亚成年大熊猫的肠道细菌菌群进行研究,发现其优势菌群为肠杆菌、肠球菌和乳杆菌;王焱等通过16rDNA-RFLP法,发现肠杆菌、志贺菌和柠檬酸杆菌为亚成年大熊猫肠道菌群中的优势细菌菌群^[24],本研究发现大熊猫肠道细菌菌群门主要为Firmicutes (61.33%)和Proteobacteria (35.09%),属主要为*Clostridium* (39.68%)、*Escherichia* (20.94%)、*Leuconostoc* (8.75%)、*Pseudomonas* (5.08%)和*Epulopiscium* (4.69%),其中*Escherichia*属于肠杆菌科,*Leuconostoc*属于乳杆菌目,本研究结果比熊焰和王焱等人的结果更为详尽,但有一定出入,其原因可能是检测方法的差异性,传统培养技术受条件限制,难以培养厌氧细菌,因而无法检测出大熊猫肠道内的*Clostridium*,进而使得实验结果出现差异,而16rDNA-RFLP法则因为没有高通量测序技术的高通量和大规模,从而使得结果出现差异^[19]。

艾生权等用RLFE法研究亚成体大熊猫肠道真菌菌群组成并发现Ascomycota (52.36%)和Basidiomycota (10.20%)两个门,*Candida*、*Debaryomyces*、*Pleosporales*、*Myriangium*、*Cystofilobasidium*、*Trichosporon*、*Leucosporidium*、*Leucosporidiella*为优势菌群^[25]。本研究结果显示,亚成年大熊猫肠道真菌菌群门主要为Ascomycota (81.56%),属主要为*Humicola* (26.43%)、*Sphaerulina* (12.42%)、*Aspergillus*

(4.49%)、*Stachybotrys* (3.17%)和*Gibellulopsis* (3.06%)。两组实验结果差异较大,其原因可能是本实验中采样的亚成年大熊猫是非圈养大熊猫,而艾生权等实验中的是圈养大熊猫。圈养和非圈养大熊猫其生存环境和食物等均有差异,而这些差异就现有报道来看,均能对肠道菌群产生影响^[14],因而两组实验得出了差异较大的两种结果。其具体影响因素还有待后续实验进行进一步的研究确认。

本研究发现预放归过程会影响大熊猫肠道菌群且真菌菌群的影响大于细菌,首先大熊猫肠道细菌菌群的多样性和真菌菌群的丰富度分别呈持续下降和上升的趋势,而细菌菌群的丰富度和真菌菌群的多样性在排除预放归阶段的情况下呈持续上升和下降的趋势,此结果说明在预放归阶段,大熊猫肠道菌群的多样性和丰富度会发生变化,导致这些变化的因素有很多,例如食物、海拔和环境^[14]等,结合预放归过程中的具体操作,推测预放归阶段中的抓捕和转运等工作使大熊猫产生应激反应^[26],是引起其肠道菌群丰富度和多样性发生变化主要因素之一。同时根据NMDS图结果显示预放归阶段大熊猫肠道细菌菌群的组成和放归阶段相似,但真菌菌群却不相似。通过此情况可发现预放归阶段对大熊猫肠道真菌的影响大于细菌,其原因可能是在预放归过程中喂食竹子的种类不同,有研究报道食物中的微生物可能对肠道菌群产生影响^[27],而竹子中以真菌菌群为主,所以导致预放归和放归阶段的大熊猫肠道中真菌菌群的差异大于细菌菌群。综合以上结果可对大熊猫放归工作提出建议,建议在经后的放归过程中尽量缩短预放归阶段的时间,且采取一定措施减少人为干扰从而降低大熊猫产生应激反应的概率,保持其肠道菌群的稳定,提高野外存活率。

同时值得注意的是在真菌的多样性上,野外大熊猫与培训和预放归大熊猫之间存在显著差异($P < 0.05$),但与放归大熊猫不存在显著差异($P > 0.05$),由此可推测由野化培训到放归过程大熊猫肠道菌群结构组成逐渐趋近野外大熊猫。为了进一步证实该推测,对前20属在培训—预放归—放归—野外的变化进行了分析,并发现大熊猫肠道细菌菌群中,*Leuconostoc*的相对丰度随培训—预放归—放归—野外的变化呈持续上升,且有研究报道*Leuconostoc*属于益生菌^[28]。*Acinetobacter*是条件致病菌,少有致病性但其毒性很强,有实例证明该菌引起过大熊猫死亡^[29],导致其含量持续下降的原因可能是培训和预放归阶段大熊猫抵抗力比放归和野外大熊猫弱,使其易感染该菌。在真菌菌群中,*Stachybotrys*能产生纤维素酶^[30],相比放归大熊猫,野外大熊猫肠道内降解纤维素的细菌相对丰度较低,但野外大熊猫主食仍是竹子,为保持其自身生长发育,仍需要纤维素降解菌,因而*Stachybotrys*含量持续升高。*Fusarium*是动植物中最重要的病原菌^[31],*Debaryomyces*可能导致大熊猫慢性腹泻^[7],造成这两类菌群含量升高的原因可能是相对圈养和培训等环境,野外和放归环境的卫生条件更差。*Cryptococcus*是一类条件性致病菌,广泛存在于鸽子粪便中,低免疫力群体感染此菌的几率更大^[32-33],因而导致其相对丰度随不同阶段变化呈持续下降趋势的原因可能是野外大熊猫免疫力大于放归大熊猫大于预放归大熊猫大于培训大熊猫。而关于*Zea*、*Retroconis*和*Lulwoana*对大熊猫的影响目前还没有相关报道,其具体功

能有待进一步考究。此结果也充分体现了自野化培训阶段到放归阶段大熊猫肠道菌群逐渐趋近野生大熊猫,然后通过与谭志等的研究^[9]对比,发现经野化培训后的大熊猫较圈养大熊猫放归后其肠道菌群更能趋近于野生大熊猫,由此可表明野化培训与放归有利于大熊猫肠道菌群的重组使其更趋近野外大熊猫肠道菌群,对提高大熊猫野外存活率有着重要作用。

此外还发现大熊猫肠道内两类主要的纤维素降解细菌 *Clostridium* 和 *Bacillus* 在放归大熊猫肠道内含量远高于野外大熊猫。同时 *Aspergillus* 和 *Sphaerulina* 的含量也远高于野外大熊猫。*Aspergillus* 能产生真菌毒素,此毒素危害巨大因而被广泛关注^[33],本研究发现放归大熊猫中 *Aspergillus* 的含量远高于其余各组,由此推测可能与放归和野外的环境的卫生条件差有关^[34],且放归大熊猫免疫力低于野外大熊猫^[35]。*Sphaerulina* 在放归大熊猫中含量大且远高于野外大熊猫,其根本的原因也极可能是环境卫生条件差,因为有相关报道证实 *Sphaerulina* 与植物病害有关^[36],大熊猫食用了感染此菌的植物则可能使其在肠道内含量升高,而放归大熊猫的免疫力以及在食物的选择上可能都比野外大熊猫更弱,因而该菌在放归大熊猫体内含量远高于野外大熊猫。关于 *Escherichia*、*Streptococcus* 和 *Lactococcus* 也是大部分文章中报道的大熊猫肠道中的优势菌群,在本文中发现放归大熊猫中这3类菌属的含量比其余各组低,但这3类菌在大熊猫体内的具体功能目前还尚待明确,因而其相对丰度变化的原因还有待进一步研究。根据此结果可知放归大熊猫的纤维素代谢能力强,但对野外环境中各类条件致病菌的耐受力 and 免疫力比野外大熊猫差,因而建议在今后的培训过程中增加大熊猫在恶劣环境中的培训,以提高其对食物的选择能力,增加其免疫力和对条件致病菌的耐受力,进而减少放归大熊猫在野外因感染病毒等死亡的概率^[35]。

本研究通过高通量测序技术探究了亚成年大熊猫肠道细菌和真菌的组成,并首次对培训、预放归、放归和野生大熊猫的肠道菌群的组成和变化进行了研究。结果发现预放归过程可能使大熊猫产生应激反应进而改变其肠道菌群,且对大熊猫肠道真菌的影响大于细菌,随着野化培训到放归阶段变化大熊猫肠道菌群逐渐趋近野生大熊猫。本文研究结果可为大熊猫种群的复壮提供基础数据,为提高放归大熊猫的存活率提供支撑。目前大熊猫的放归工作仍处于探索阶段,且放归大熊猫数量十分稀少,因而本文仅对一只大熊猫进行了追踪研究,待放归技术成熟,参与放归的大熊猫数量增加,我们将同时追踪多只放归大熊猫,研究其放归过程中肠道菌群的组成、变化和个体间差异等,从而对现阶段数据进行进一步的补充完善。

参考文献 [References]

- Bai W, Connor T, Zhang J, Yang H, Dong X, Gu X, Zhou C. Long-term distribution and habitat changes of protected wildlife: giant pandas in Wolong nature reserve, China [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, **25**: 1-9
- 罗永久, 何廷美, 钟志军, 王承东, 王晓艳, 吴虹林, 程安春, 何永果, 李才武, 张和民, 李德生, 杨海迪, 彭广能. 圈养大熊猫食性转换前期肠道细菌多样性[J]. 中国兽医学报, 2013, **33** (12): 1896-1901 [Luo YJ, He YM, Zhong ZJ, Wang CD, Wang XY, Wu HL, Cheng AC, He YG, Li CW, Zhang HM, Li DS, Yang HD, Peng GN. The diversity of intestinal bacterial flora of captive giant panda in the prophase of diet cnversion [J]. *Chin Vet Sci*, 2013, **33** (12): 1896-1901]
- 郭明月, 黄国印, 马晓瑞, 魏从翀, 陈芳芳, 胡超, 徐辉, 乔代蓉, 曹毅. 大熊猫肠道产果胶酶细菌的多样性及产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22** (1): 127-132 [Guo MY, Huang GY, Ma XR, Wei CC, Chen FF, Hu C, Xu H, Qiao DR, Cao Y. Biodiversity and characterization of pectinase-producing bacteria isolated from giant panda gut [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, **22** (1): 127-132]
- 张晋东, 李玉杰, 王玉君, 欧阳志云, 乔麦菊, 张和民. 野生大熊猫种群数量两种调查方法对比[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (6): 1142-1147 [Zhang JD, Li YJ, Wang YJ, Ou YZY, Qiao MJ, Zhang HM. Comparison of two investigation methods for population of wild giant pandas [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (6): 1142-1147]
- 杨波, 杨承忠, 涂飞云, 杜一平, 刘洋, 李德生, 张和民, 黄炎. 大熊猫野化放归中的遗传学分析[J]. 四川动物, 2013, **32** (1): 149-155 [Yang B, Yang CZ, Tu FY, Du YP, Liu Y, Li DS, Zhang HM, Huang Y. The genetics analysis of captive giant panda reintroduction [J]. *Sichuan J Zool*, 2013, **32** (1): 149-155]
- Hayward MW, Adendorff J, Moolman L, Hayward GJ, Keley GIH. The successful reintroduction of leopard panthera pardus to the addo Elephant national park [J]. *Afr J Ecol*, 2010, **45** (1): 103-104
- Smith DW, Mech LD, Meagher M, Clark WE, Jaffe R, Phillips MK, Mack JA. Wolf-bison interactions in yellow stone national park [J]. *J Mammal*, 2000, **81** (4): 1128-1135
- 蒋志刚. 普氏野马(*Equus przewalskii*) [J]. 动物学杂志, 2004, **39** (2): 100-101 [Jiang ZG, Wild horse (*Equus przewalskii*) [J]. *Chin J Zool*, 2004, **39** (2): 100-101]
- 谭志, 鲍楠, 赖翼, 张和民, 李德生, 刘成君. 野外放归大熊猫和圈养大熊猫肠道正常菌群的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, **41** (6): 1276-1279 [Tan Z, Bao N, Lai Y, Zhang HM, Li DS, Liu CJ. The study on the normal intestinal microflora of the giant panda returned to wild and the giant panda in captivity [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, **41** (6): 1276-1279]
- 宋仕贤, 张明春, 张亚辉, 黄炎, 李德生, 周小平, 张和民. 野化培训大熊猫领域行为的初步研究[J]. 四川林业科技, 2016, **37** (3): 112-115 [Song SX, Zhang MC, Zhang YH, Huang Y, Li DS, Zhou XP, Zhang HM. A study of the home range behaviors for the pre-released giant panda [J]. *J Sichuan Forestry Sci technol*, 2016, **37** (3): 112-115]
- 胡旭, 王涛, 梁姗, 李薇, 吴晓莉, 金锋. 肠道微生物与认知功能[J]. 中国微生态学杂志, 2015, **27** (11): 1359-1364 [Hu X, Wang T, Liang S, Li W, Wu XL, Jin F. The role of gut microbiota in cognitive function [J]. *Chin J Microecol*, 2015, **27** (11): 1359-1364]
- 王立志, 徐谊英. 圈养大熊猫粪便中微生物多样性的研究[J]. 四川动物, 2016, **35** (1): 17-23 [Wang LZ, Xu YY. Diversity of microorganism in the feces of captive giant pandas [J]. *Sichuan J Zool*, 2016, **35** (1): 17-23]
- 邹兴淮, 曾鲁军, 孙中武, 闫文, 何光昕, 吴孔菊, 陈玉春, 翁妮娜. 大熊猫疾病死亡因素分析及其保护对策[J]. 东北林业大学学报, 1998 (1): 53-56 [Zou XH, Zeng LJ, Sun ZW, Yan W, He GX, Wu KJ, Chen YC, Weng NN. Analysis of lethal factors of diseased giant pandas and

- prevention countermeasures [J]. *J NE For Univ*, 1998 (1): 53-56]
- 14 杨伟平, 王建刚, 曹斌云. 猪肠道微生物群落组成变化及其影响因素[J]. 中国畜牧杂志, 2017, **53** (1): 12-16 [Yang WP, Wang JG, Cao BY. Composition and influence factors of pigs' gut microbial community [J]. *Chin J Anim Sci*, 2017, **53** (1): 12-16]
- 15 楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, **30** (15): 256-260 [Lou J, Wang JG, Li Y. Review of high-throughput sequencing techniques in studies of soil microbial diversity [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, **30** (15): 256-260]
- 16 Hartmann A, Singh M, Klingmüller W. Comparison of spatial positioning between radio telemetry (RT) and GPS in temperate mountain forests: a case study on tracking the reintroduction of captive giant pandas [J]. *Acta Theriol Sin*, 2012, **32** (3): 193-202
- 17 张明春, 黄炎, 李德生, 张和民, 周世强, 黄金燕, 刘巍, 周小平. 圈养大熊猫野化培训期的生境选择特征[J]. 生态学报, 2013, **33** (19): 6014-6020 [Zhang MC, Huang Y, Li DS, Zhang HM, Zhou SQ, Huang JY, Zhou XP. Habitat selection of the pre-released giant panda in Wolong nature reserve [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, **33** (19): 6014-6020]
- 18 张泽钧, 张陕宁, 魏辅文, 王鸿加, 李明, 胡锦矗. 移地与圈养大熊猫野外放归的探讨[J]. 兽类学报, 2006, **26** (3): 292-299 [Zhang ZJ, Zhang SN, Wei FW, Wang HJ, Li M, Hu JC. Translocation and discussion on reintroduction of captive giant panda [J]. *Acta Theriol Sin*, 2006, **26** (3): 292-299]
- 19 何永果, 晋蕾, 李果, 李才武, 李蓓, 李伟, 张亚辉, 胡正泉, 黄炎, 张和民, 邹立扣. 基于高通量测序技术研究成年大熊猫肠道菌群[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (5): 771-777 [He YG, Jin L, Li G, Li CW, Li B, Li W, Zhnag YH, Hu ZQ, Huang Y, Zhang HM, Zou LK. Gut microbiome of adult giant pandas based on high-throughput sequencing technology [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (5): 771-777]
- 20 Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (23): 7537-7541
- 21 Edgar RC, Hass BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27** (16): 2194
- 22 Schnorr SL, Candel AM, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C. Gut microbiome of the hadza hunter-gatherers [J]. *Nat Commun*, 2014, **5** (3654): 3654
- 23 熊焰, 李德生, 王印, 彭广能, 张和民, 张贵权. 卧龙自然保护区大熊猫粪样菌群的分离鉴定与分布研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, **31** (2): 165-170 [Xiong Y, Li DS, Wang Y, Peng GN, Zhang HM, Zhang GQ. Study of the bacterial isolation, identification and distribution of the feces from giant panda in Wolong Nature Protection Area [J]. *Acta Veter Zootechn Sin*, 2000, **31** (2): 165-170]
- 24 王焱, 何延美, 钟志军, 王承东, 何永果, 程安春, 李才武, 崔婷婷, 李德生, 彭广能. 不同季节亚成体大熊猫肠道菌群ERIC-PCR指纹图谱分析[J]. 中国兽医科学, 2011, **41** (8): 778-783 [Wang Y, He YM, Zhong ZJ, Wang CD, He YG, Cheng AC, Li CW, Cui TT, Li DS, Peng GN. Analysis of the characteristics of intestinal flora with seasonal shift in subadult giant panda by ERIC-PCR fingerprinting [J]. *Chin Vet Sci*, 2011, **41** (08): 778-783]
- 25 艾生权, 钟志军, 彭广能, 王承东, 罗永久, 何延美, 谷武阳, 李才武, 李刚诗, 吴虹林, 刘学涵, 夏玉, 刘艳红, 周潇潇. 亚成体大熊猫肠道真菌多样性[J]. 微生物学报, 2014, **54** (11): 1344-1352 [Ai SQ, Zhong ZJ, Peng GN, Wang CD, Luo YJ, He YM, Gu WY, Li CW, Li GS, Wu HL, Liu XH, Xia Y, Liu YH, Zhou XX. Intestinal fungal diversity of sub-adult giant panda [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2014, **54** (11): 1344-1352]
- 26 毕温磊, 侯蓉, 费立松, 张志和, 陈鹏, 罗婵, 李明喜, 向左甫, 古晓东, 齐敦武. 迁入都江堰野放中心的大熊猫野化放归个体皮质醇水平变化初步研究[J]. 四川动物, 2014, **33** (1): 8-12 [Bi WL, Hou R, Fei LS, Zhang ZH, Chen P, Luo L, Li MX, Xiang ZF, Gu XD, Qi DW. Variation of fecal steroid hormone level of giant panda between Chengdu research base of giant panda breeding and Dujiangyan research center [J]. *Sichuan J Zool*, 2014, **33** (1): 8-12]
- 27 陈卫. 肠道菌群: 膳食与健康研究的新视角[J]. 食品科学技术学报, 2015, **33** (6): 1-6 [Chen W. Gut microbiota—a new concern on health regulation [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, **33** (6): 1-6]
- 28 成文玉, 金红星, 胡炎华, 史建波, 杨希寅. 申串珠菌筛选与分类的研究进展 [J]. 中国酿造, 2010, **29** (3): 7-9 [Cheng WY, Jin HX, Hu YH, Shi JB, Yang XY. Research development of screening and classification of *Leuconostoc* [J]. *Chin Brewing*, 2010, **29** (3): 7-9]
- 29 陈永林, 张成林, 胥哲. 大熊猫不动杆菌病的病原鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2001 (4): 35-36 [Chen YL, Zhang CL, Xu Z. Pathogenic identification of acinetobacter disease of great panda [J]. *Chin J Veter Drug*, 2001 (4): 35-36]
- 30 杜宗军, 季明杰, 陈冠军, 高培基. 黑色葡萄状链霉S607耐碱性纤维素酶发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2001, **31** (4): 22-25 [Du ZJ, Ji MJ, Chen GJ, Gao PJ. Solid fermentation of *Aspergillus niger* SL2-111 producing multi-enzymes [J]. *Ind Microbiol*, 2001, **31** (4): 22-25]
- 31 张卫娜, 贾谏, 陆晓宇, 陈中健, 孔谦, 陈庄. 镰刀菌属真菌毒素的研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, **40** (15): 130-133 [Zhang WN, Jia J, Lu XY, Chen ZJ, Kong Q, Chen Z. Research advance on *Fusarium mycotoxins* [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2013, **40** (15): 130-133]
- 32 曹林, 沈继录. 隐球菌检验方法的应用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018 (1): 113-117 [Cao L, Shen JL. Application of laboratory tests for identifying *Cryptococcus* [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2018, (1): 113-117]
- 33 黄晓静, 王少敏, 毛丹, 苗水, 季申. 曲霉属真菌毒素的毒性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017 (5): 1679-1687 [Huang XJ, Wang SM, Mao D, Miao S, Ji S. Research progress on toxicity of *Aspergillus mycotoxins* [J]. *J Food Safety Quality*, 2017 (5): 1679-1687]
- 34 鲍楠. 野外放归大熊猫肠道菌群变化的研究[D]. 成都: 四川大学, 2006 [Bao N. Studies on changes of the intestinal microflora in giant panda returned to the wild [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006]
- 35 周晓, 曾晶霞, 黄炎, 黄金燕, 周世强, 张和民, 李德生. 圈养大熊猫个体特点对放归后生存的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2014, **48** (2): 260-264 [Zhou X, Zeng CX, Huang Y, Huang JY, Zhou SL, Zhang HM, Li DS. Discussion on individual animal traits influencing post-release survival of captive-bred giant panda. *J Huazhong Nor Univ (Nat Sci)*, 2014, **48** (2): 260-264]
- 36 朱天辉, 孙绪良. 园林植物病虫害防治[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 23-32 [Zhu TH, Sun XG. Garden Plant Pest and Control [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2007: 23-32]