

# 基于高通量测序技术分析中国荷斯坦奶牛瘤胃纤毛虫的物种多样性

何金英<sup>1</sup>, 徐勤辉<sup>1</sup>, 王宇嘉<sup>1</sup>, 江奕希<sup>1</sup>, 黄一菲<sup>1</sup>, 李曼<sup>1</sup>, 熊杰<sup>2</sup>, 冯金梅<sup>1</sup>

(1. 江汉大学医学部 病原生物学教研室, 武汉 430056; 2. 中国科学院 水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

**摘要:** 瘤胃纤毛虫是反刍动物瘤胃微生态系统的重要组成部分, 在调控瘤胃微环境及参与其宿主动物的生理功能等方面具有重要作用。然而, 家养反刍动物瘤胃中的瘤胃纤毛虫物种多样性及不同动物个体间瘤胃纤毛虫群落结构的差异仍不清楚。采用基于 18S rRNA 基因的高通量测序技术, 解析了中国荷斯坦奶牛瘤胃内纤毛虫的物种多样性和宿主不同个体间的差异。选取 3 头成年健康中国荷斯坦奶牛共采集了 9 个瘤胃液样品, 提取样品总 DNA 后, 采用瘤胃纤毛虫 18S rRNA 基因 V5~V8 区特异性引物进行扩增, 扩增产物使用 Ion S5™ XL 平台测序。去除低质量序列和嵌合体后, 共获得 721 250 条高质量有效序列, 基于 97% 的序列一致性聚类获得 38 个操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)。不同个体样品间在  $\alpha$  多样性 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数上, 差异不显著。OTUs 的物种分布属于纤毛门裂口纲毛口亚纲。在属水平分类上, 它们主要分布于 10 个已知的瘤胃纤毛虫的属, 其中内毛属是相对丰度最高的属, 同时还检测到一些未被分类和鉴定的瘤胃纤毛虫。同一牧场同一饲喂条件下的不同个体之间, 瘤胃纤毛虫的物种多样性没有显著差异, 但不同个体之间在均匀度上存在一定的差异。研究结果将为瘤胃纤毛虫的高通量测序分析和综合分类学研究提供参考。

**关键词:** 瘤胃纤毛虫; 原生生物; 多样性; 18S rRNA 基因测序; 分类学

**中图分类号:** Q939

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-2367(2025)04-0132-09

反刍动物瘤胃内定居有大量的瘤胃微生物, 包括细菌、古菌、真菌、原生动物和病毒等, 其中的原生动物主要是瘤胃纤毛虫。瘤胃纤毛虫广泛存在于家养反刍动物牛和羊的瘤胃中, 其密度可达  $10^5 \sim 10^6$  mL<sup>-1</sup> 瘤胃液, 占瘤胃内微生物总生物量的 50%<sup>[1-2]</sup>。瘤胃纤毛虫在稳定瘤胃内环境、降解植物纤维素、调控瘤胃微生物组成和与瘤胃原核生物互作产甲烷等方面发挥着重要作用<sup>[3-6]</sup>。

瘤胃纤毛虫的种类繁多, 宿主瘤胃内瘤胃纤毛虫的物种组成和物种数目根据宿主的种类、饲喂条件、日粮组成和昼夜变化等发生变化<sup>[7-9]</sup>。目前已报道多种不同宿主的瘤胃纤毛虫类群超过 42 个属多达 250 余种形态种(morphospecies)<sup>[10-11]</sup>。长期以来, 光学显微镜下的形态观察鉴定被广泛认为是研究瘤胃纤毛虫物种多样性和密度的金标准<sup>[11-12]</sup>。然而, 光学显微镜下的形态观察鉴定瘤胃纤毛虫不仅繁琐耗时, 而且对分类学专业知识的依赖性很强, 同时可能由于瘤胃纤毛虫的多种形态种以及一些瘤胃纤毛虫物种在采样和处理过程中易发生裂解等原因而导致错估瘤胃纤毛虫的类群和丰度。

**收稿日期:** 2024-06-13; **修回日期:** 2024-09-06。

**基金项目:** 国家自然科学基金(32070420; 32470437); 国家重点研发计划项目(2022YFF1001100)。

**作者简介:** 何金英(1997—), 女, 湖北恩施人, 江汉大学硕士研究生, 研究方向为病原生物学, E-mail: 1925015304@qq.com。

**通信作者:** 冯金梅, E-mail: fengjm@jhun.edu.cn。

**引用本文:** 何金英, 徐勤辉, 王宇嘉, 等. 基于高通量测序技术分析中国荷斯坦奶牛瘤胃纤毛虫的物种多样性[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2025, 53(4): 132-140. (He Jinying, Xu Qinhui, Wang Yujia, et al. High-throughput sequencing deciphering diversity and individual variability of rumen ciliate protozoa in Chinese Holstein dairy cows[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2025, 53(4): 132-140. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.06.13.0001.)

随着分子生物学研究技术的进展,分子生物学研究方法在描述自然种群中微生物群落多样性方面的应用逐渐增多<sup>[13-15]</sup>.高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术是一种快速发展的不依赖于培养而可全面反映未培养样品中微生物的多样性和组成特点的分子生物学技术,与传统的测序技术相比,HTS 技术具有更高的测序速度、更低的碱基成本和更高的准确性优势<sup>[16-17]</sup>.近年来,HTS 技术被广泛应用于揭示瘤胃微生态系统中原核微生物的组成和群落多样性<sup>[18-24]</sup>.此外,利用 HTS 技术还揭示了不同反刍动物个体间瘤胃内细菌群落的差异性<sup>[25]</sup>.虽然末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、实时聚合酶链反应(qPCR)和 18S rRNA 基因焦磷酸测序等多种分子生物学方法也被用于研究瘤胃微生态系统中真核微生物瘤胃纤毛虫的物种多样性<sup>[26-30]</sup>,但尚缺乏采用高通量测序技术全面揭示家养反刍动物瘤胃微生态系统中瘤胃真核微生物瘤胃纤毛虫的物种多样性和宿主个体间差异性的研究报道.

中国荷斯坦奶牛是世界上产奶量最高、饲养数量最多的奶牛品种,作为优质奶源在我国也具有广阔的市场前景.本研究采用高通量的 18S rRNA 基因扩增子测序技术,研究了常见家养反刍动物中国荷斯坦奶牛瘤胃微生态系统中瘤胃纤毛虫的物种多样性及其在宿主个体间的差异性.在中国荷斯坦奶牛瘤胃中共鉴定到 38 个 OTU,主要分布于 10 个瘤胃纤毛虫的已知属,其中内毛属是相对丰度最高的属.饲喂条件相同的中国荷斯坦奶牛的不同宿主个体间,瘤胃纤毛虫物种的丰富度和群落结构没有显著差异,但物种均匀度略有差异.该研究工作将为瘤胃纤毛虫的高通量测序分析和综合分类学研究提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和固定

本研究所进行的瘤胃液采集实验经江汉大学学术伦理审查委员会审查(编号:JHDXLL2020-002),符合相关法律法规以及相关伦理原则.在武汉市江夏区某农场,选用 3 头年龄在 3~5 岁之间、平均质量为(558±14.6) kg 的健康三胎泌乳中期的中国荷斯坦奶牛,分别标记为 AC1、AC2 和 AC3,进行瘤胃液样品采集.这些奶牛的饲喂方式和瘤胃液样品的采集方法<sup>[7]</sup>与文献[31]一致.每头奶牛采集 3 份瘤胃液样品,分别标记为 AC1.1、AC1.2、AC1.3、AC2.1、AC2.2、AC2.3、AC3.1、AC3.2 和 AC3.3.采集的瘤胃液样品立即存放在干冰中,运送到实验室后保存在-80℃,备用于后续瘤胃微生物基因组 DNA 的提取.

### 1.2 DNA 提取、18S rRNA 基因扩增和高通量测序

使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen)试剂盒提取瘤胃微生物基因组的 DNA,具体操作方法参照试剂盒说明书进行.采用紫外可见分光光度计(NanoDrop-ND1000)和质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的纯度和浓度,提取质量合格的 DNA 使用无菌水稀释至 1 ng/μL,送至北京诺禾致源科技股份有限公司扩增纤毛虫 18S rRNA 基因的 V5 至 V8 可变区(约 500 bp).参照前人报道<sup>[32]</sup>,瘤胃纤毛虫 18S rRNA 基因特异性引物 RP 841F (5'-GACTAGGGATTGGARTGG-3') 和 Reg 1302R (5'-AATTG-CAAAGATCTATCCC-3')用于扩增纤毛虫 18S rRNA 基因的 V5 至 V8 可变区,预期扩增产物大小约为 500 bp<sup>[27]</sup>.PCR 反应在 30 μL 反应体系中进行,包括 15 μL Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs)、0.2 μmol/L 的正向和反向引物、10 ng 模板 DNA 和剩余体积的无酶无菌水.PCR 反应条件为:98℃预变性 1 min,98℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,最后 72℃延伸 5 min.PCR 产物采用质量分数 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,使用 GeneJET™ Gel Extraction Kit(Thermo Scientific)纯化扩增产物.按照 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns(Thermo Scientific)的说明书生成测序文库,使用 Qubit® 2.0 Fluorometer(Thermo Scientific)评估文库质量.最后,采用 Ion S5™ XL 平台对质量合格文库进行 400~600 bp 读长的单端测序.

### 1.3 数据分析

测序获得的 Fastq 格式的原始数据(raw data)采用 Cutadapt<sup>[33]</sup>过滤去除低质量序列和使用 UCHIME 算法<sup>[34]</sup>去除嵌合体序列,得到有效数据(clean data)用于后续分析.使用 Uparse(v7.0.1001)软件<sup>[35]</sup>进行序列比对分析,按 97%的序列相似性进行归并和 OTU 划分.OTU 的丰度信息采用与序列最少的样品相对应的序列数目为标准进行均一化.每个 OTU 中丰度最高的序列被选取作为该 OTU 的代表序列,根据每个 OTU

在每个样本中的序列数目,构建 OTU 在每个样本中丰度的矩阵文件.获得的 OTU 分别与 PR<sup>2</sup> 数据库(the protist ribosomal reference database, 原生动物核糖体参考数据库)(v4.12.0)<sup>[36]</sup> 和 SILVA 数据库(SSURefNR99138)<sup>[37]</sup> 进行比对,对 OTU 代表序列进行物种分类.比较参考上述两个公共数据库对 OTU 的分类结果,采用注释序列较多的参考数据库的结果用于后续分析.

采用 QIIME(quantitative insights into microbial ecology)软件(v1.9.1)<sup>[38]</sup> 进行了 α 多样性和 β 多样性分析,并利用 R 软件(v2.15.3)进行结果展示.α 多样性分析计算了 Observed species、Chao1、abundance-based coverage estimator(ACE)、goods\_coverage、Shannon 和 Simpson 等指数.β 多样性分析采用 QIIME 软件(v1.9.1)计算了加权和非加权 UniFrac 指数.在 R 软件(v2.15.3)中,使用 WGCNA 包、stat 包和 ggplot2 包进行主坐标分析(PCoA),并使用相似性分析(ANOSIM)<sup>[39]</sup> 检验个体之间的差异显著性.

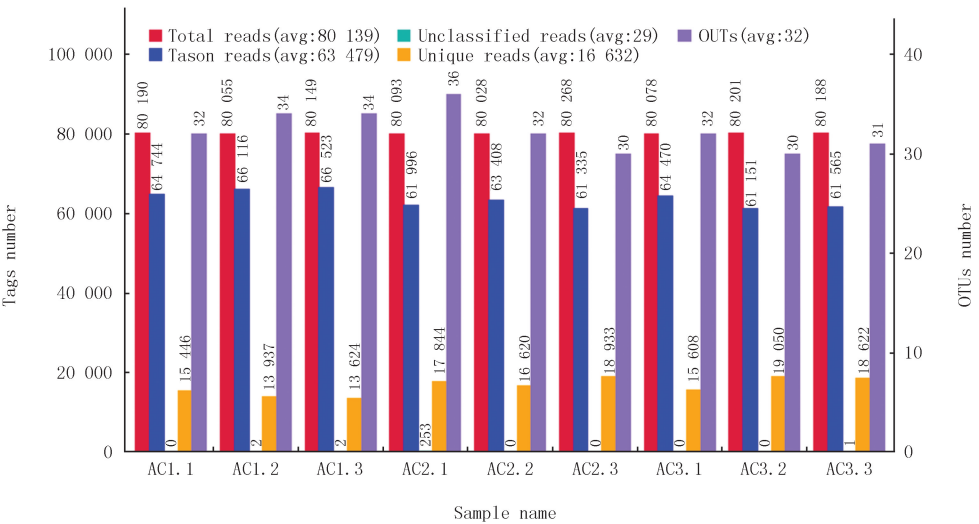
1.4 瘤胃纤毛虫的显微观察和计数

AC1、AC2 和 AC33 头牛的瘤胃液样品用甲基绿-福尔马林溶液固定后,在光学显微镜(美国 NEXCOPE NE610)下观察和计数各样品中瘤胃纤毛虫的种属组成,具体的固定方法和瘤胃纤毛虫种属组成计数的方法与前期研究一致<sup>[7]</sup>.

2 结 果

2.1 测序深度、覆盖率和生物信息学分析总结

本研究从 3 头中国荷斯坦奶牛的 9 个样品中共获得了 721 264 条原始序列.经过质量过滤后,获得了 721 250 条有效序列,序列平均长度为(476.7±0.47) bp.基于序列一致性为 97%的原则对所有有效序列进行 OTU 聚类,共获得 38 个 OTU,每个样品的 OTU 数量平均为 32 个,其中样品 AC2.3 和 AC3.2 包含的 OTU 数最少为 30 个,样品 AC 2.1 包含的 OTU 数最多为 36 个(图 1).

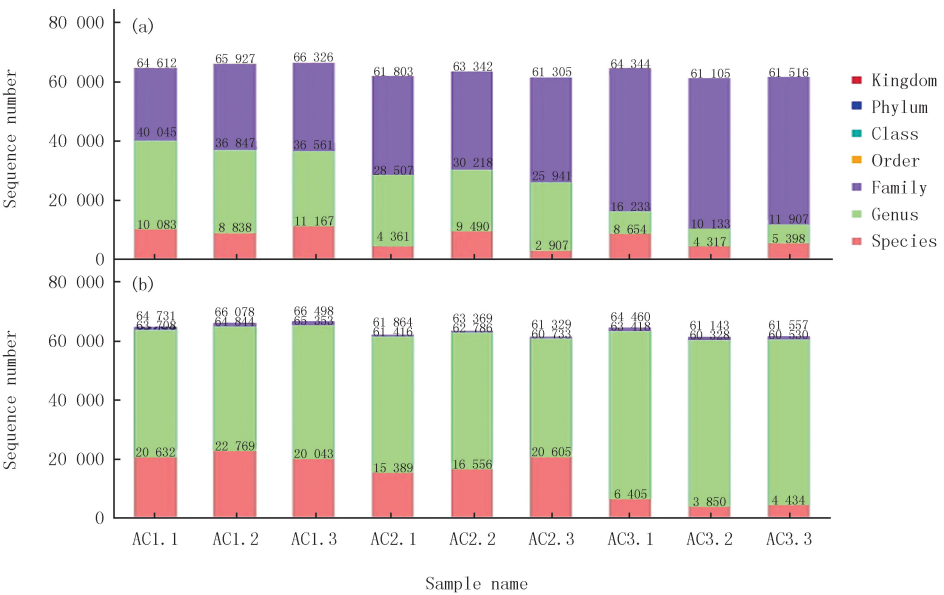


注:avg表示平均值.

图1 测序数据统计总结

Fig.1 Summary of sequencing data statistics

比较参考 PR<sup>2</sup> 数据库和 SILVA 数据库的 OTU 的分类结果,我们发现,参考两个不同的公共数据库分配给界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)分类阶元的序列数量几乎相同;然而,在科,尤其是在属(Genus)和种(Species)分类阶元时,参考 SILVA 数据库比参考 PR<sup>2</sup> 数据库注释了更多的序列(图 2).因此,本研究后续分析中采用参考 SILVA 数据库的注释结果进行 OTU 的分类.AC1、AC2 和 AC3 3 头奶牛的样品共享 34 个 OTUs.与此同时,AC2 个体样品具有 4 个独特的 OTUs.稀释曲线呈现了 OTUs 中序列的数目与瘤胃纤毛虫物种丰富度之间的关系,在本研究的测序深度下,每个样品的稀释曲线都从起始的陡峭的斜率到最终均趋于平缓,表明本研究的测序深度足以识别每个样品中的微生物.



(a)参考PR2数据库, (b)参考SILVA数据库. 界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)和目(Order)这4个分类阶元被注释到的测序序列数目几乎一致, 图中它们的柱子重叠, 仅列出科属种水平的序列数目作为代表.

图2 基于参考公共数据库的序列分类统计  
Fig.2 Statistics of taxonomy assignment of sequences

2.2 多样性分析

表 1 总结了反映每个样品中瘤胃纤毛虫丰富度和均匀度的  $\alpha$  多样性的度量指数.每个样品的 goods\_coverage 均为 100%,表明 9 个不同样品的测序深度都是准确且可比较的,测序覆盖度均已饱和.Observed species、Chao1、ACE 和 goods\_coverage 指数被用来评估瘤胃纤毛虫物种的丰富度,Simpson 和 Shannon 指数被用来评估瘤胃纤毛虫物种的均匀度.表 2 和表 3 展示了 3 个个体样品的  $\alpha$  多样性指数及比较分析结果, Observed species、Chao1、ACE 和 goods coverage 指数在 3 个个体之间没有显著差异,表明不同个体宿主的瘤胃纤毛虫物种的丰富度没有显著差异.AC1 和 AC2 之间的 Simpson 和 Shannon 指数没有显著差异,表明它们之间的物种均匀度没有显著差异;AC1 和 AC2 的 Simpson 和 Shannon 指数显著高于 AC3 对应的指数,表明 AC1 和 AC2 个体间的不同 OTUs 比 AC3 个体的 OTUs 分布更均匀.

表 1 每个样品的  $\alpha$  多样性指数

Tab. 1 Summary of alpha diversity indexes of each sample

| Individual | Observed species | Chao1 | ACE    | Good's coverage | Shannon | Simpson |
|------------|------------------|-------|--------|-----------------|---------|---------|
| AC1.1      | 32               | 32    | 32.000 | 100%            | 3.879   | 0.910   |
| AC1.2      | 34               | 34    | 35.033 | 100%            | 3.845   | 0.909   |
| AC1.3      | 34               | 34    | 34.000 | 100%            | 3.906   | 0.914   |
| AC2.1      | 36               | 36    | 36.000 | 100%            | 3.821   | 0.906   |
| AC2.2      | 32               | 32    | 32.000 | 100%            | 3.961   | 0.920   |
| AC2.3      | 30               | 30    | 30.521 | 100%            | 3.583   | 0.886   |
| AC3.1      | 31               | 31    | 31.544 | 100%            | 3.208   | 0.809   |
| AC3.2      | 30               | 31    | 34.083 | 100%            | 2.710   | 0.699   |
| AC3.3      | 30               | 31    | 34.083 | 100%            | 2.910   | 0.749   |

为比较不同个体间瘤胃纤毛虫群落结构的差异性,基于加权和未加权的 UniFrac 距离矩阵进行了 PCoA 和 ANOSIM 相似性分析.PCoA 结果显示,3 个个体的 9 个样本的数据没有显著差异,来自不同个体的样本聚集在一起(附录图 S1).ANOSIM 相似性分析结果(表 4)表明,AC1、AC2 和 AC3 个体之间的瘤胃

纤毛虫群落结构没有显著差异.这些结果表明,相同饲喂条件下圈养在同一牧场的奶牛不同个体样品间的瘤胃纤毛虫的群落结构无显著性差异.

表 2 3 个个体样品的  $\alpha$  多样性指数  
Tab. 2 Summary of alpha diversity indexes of each individual

| Individual | Observed species | Chao1  | ACE    | Good's coverage | Shannon | Simpson |
|------------|------------------|--------|--------|-----------------|---------|---------|
| AC1        | 33               | 33.333 | 33.678 | 100%            | 3.877   | 0.911   |
| AC2        | 32               | 32.667 | 32.840 | 100%            | 3.788   | 0.904   |
| AC3        | 30               | 31.000 | 32.237 | 100%            | 2.943   | 0.752   |

表 3 3 个个体样品的  $\alpha$  多样性指数比较  
Tab. 3 Comparisons of alpha diversity indexes of different individuals

| Individuals | P-value          |       |      |                 |         |         |
|-------------|------------------|-------|------|-----------------|---------|---------|
|             | Observed species | Chao1 | ACE  | Good's coverage | Shannon | Simpson |
| AC2-AC1     | 0.49             | 0.43  | 0.71 | NT              | 0.51    | 0.51    |
| AC3-AC1     | 0.06             | 0.10  | 0.85 | NT              | 0.01    | 0.01    |
| AC3-AC2     | 0.17             | 0.31  | 0.85 | NT              | 0.03    | 0.03    |

注:  $P<0.05$  表示显著差异,NT 代表不同个体之间的相同值.

表 4 中国荷斯坦奶牛不同宿主个体瘤胃纤毛虫结构的相似性分析  
Tab. 4 ANOSIM for rumen ciliate structures in different host individual of Chinese Holstein dairy cows

| Individual | AC1   |     | AC2   |     | AC3   |     |
|------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
|            | R     | P   | R     | P   | R     | P   |
| AC1        | —     | —   | 0.741 | 0.1 | 1.000 | 0.1 |
| AC2        | 0.741 | 0.1 | —     | —   | 1.000 | 0.1 |
| AC3        | 1.000 | 0.1 | 1.000 | 0.1 | —     | —   |

注:  $P<0.05$  表示显著差异,“—”表示无数据.

2.3 瘤胃纤毛虫群落结构

图 3 展示了基于高通量测序技术分析的瘤胃纤毛虫群落在属和种分类水平的组成和结构(图 3(a)和图 3(b))以及采用光学显微镜观察鉴定的瘤胃纤毛虫属水平的丰度分布(图 3(c)).在属分类水平,所有样品中共鉴定出 10 个已知属,各样品中瘤胃纤毛虫属水平的群落组成见图 3(a),其中内毛属(*Entodinium*)的相对丰度最高,占 30.55%,头毛属(*Ophryoscolex*)、双毛属(*Diplodinium*)、多甲属(*Polyplastron*)和单甲属(*Eremoplastron*)的相对丰度分别为 29.34%、11.67%、9.33%和 8.85%,其他 5 个属厚毛属(*Dasytricha*)、后毛属(*Metadinium*)、等毛属(*Isotricha*)、双甲属(*Diploplastron*)和 *Blepharocorys*,它们的相对丰度均小于 5%.此外,还有未分类的其他属.在 3 个不同个体样品中,AC1 和 AC2 个体中最主要的属是内毛属,其次是头毛属;而在 AC3 个体中,头毛属是最主要的属,其次是内毛属(图 3(a)).在种水平,仅注释到 7 个已知的物种(图 3(b)),表明在 SILVA 数据库中仍有大量瘤胃纤毛虫的 18S rDNA 序列未知.采用光学显微镜观察鉴定计数 3 个个体样品中瘤胃纤毛虫各属的组成,结果 AC1、AC2 和 AC3 个体样品中分别鉴定到 9 个、12 个和 10 个属的瘤胃纤毛虫,显微镜观察鉴定到的 12 个属包括了基于高通量测序分析鉴定的 9 个属,显微镜观察中发现但在高通量测序分析中未鉴定到的 3 个属为低丰度的真双毛属(*Eudiplodinium*)、硬甲属(*Ostracodinium*)和前毛属(*Epidinium*).采用两种不同的研究方法均发现内毛属是中国荷斯坦奶牛瘤胃内丰度最高的属(图 3(c)).以上结果表明采用高通量测序方法和光学显微镜观察法均能较好的鉴定出样品中常见的瘤胃纤毛虫物种,但对于丰度较低的物种,高通量测序方法可能会产生假阴性.

3 讨 论

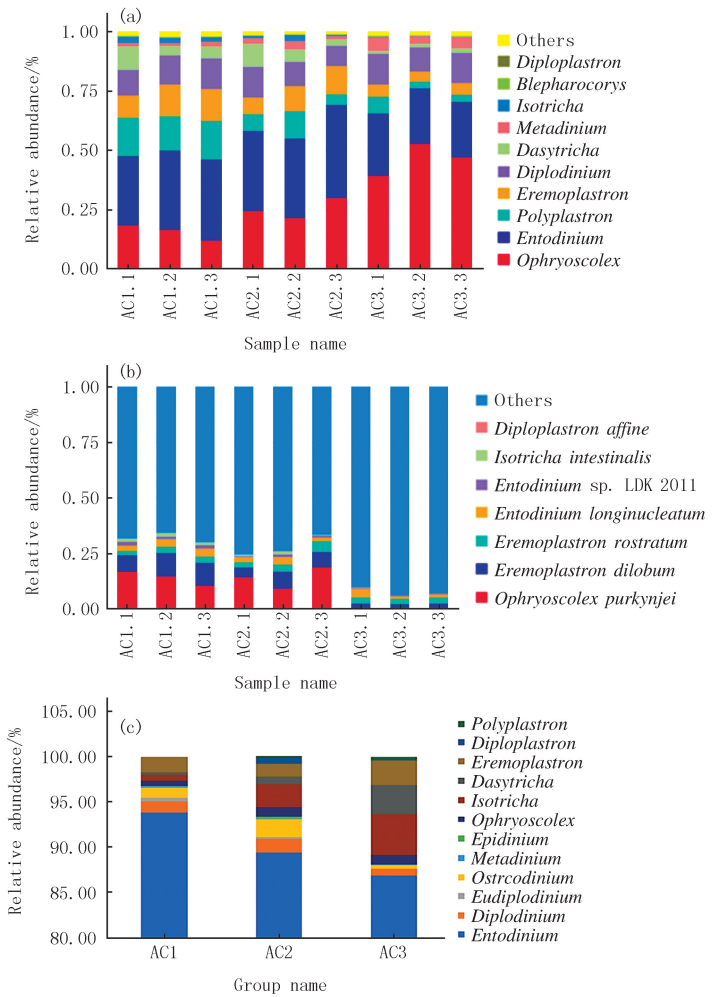
瘤胃纤毛虫是反刍动物瘤胃中最主要的真核微生物原生动物.由于瘤胃纤毛虫难以被分离和体外维持

培养<sup>[40]</sup>,导致收集瘤胃纤毛虫物种信息十分困难.随着分子生物学技术的快速发展,18S rRNA 基因已成为从环境样品中检测未培养真核生物的重要标记基因.本研究中,我们采用不依赖于培养的高通量的 18S rRNA 基因扩增子测序技术,分析了中国荷斯坦奶牛瘤胃纤毛虫物种的多样性和宿主不同个体间瘤胃纤毛虫物种的差异.

采用高通量测序技术,在 3 头牛的 9 个样品中,共检测到 38 个瘤胃纤毛虫的 OTUs,其中有 34 个 OTUs 在 3 个个体样品中共享,远远少于以前<sup>[19,24]</sup>在反刍动物瘤胃中使用 16S rRNA 基因扩增子测序鉴定到的瘤胃细菌 OTUs 的数量<sup>[25]</sup>.本研究中瘤胃纤毛虫群落的  $\alpha$  多样性指数,包括 Chao1、ACE、Shannon 和 Observed species 等指数,也远远低于以前报道的瘤胃细菌群落对应的指数<sup>[18,24]</sup>.所有这些结果表明,在使用高通量测序方法时,瘤胃细菌的多样性和丰度也明显高于反刍动物瘤胃中的瘤胃纤毛虫的多样性和丰度.相比较于前期基于分子生物学方法研究的瘤胃纤毛虫物种多样性的结果,本研究使用高通量测序技术获得的瘤胃纤毛虫的 OTUs 数量远远高于以传统测序方法报道的牛瘤胃纤毛虫的数量<sup>[29-30]</sup>,表明传统的测序方法可能低估了瘤胃纤毛虫的多样性.此外,本研究中奶牛瘤胃纤毛虫物种的 Shannon 指数明显高于使用 T-RELP 方法研究的牛瘤胃纤毛虫物种的 Shannon 指数<sup>[26]</sup>,表明高通量测序分析明显优于 T-RELP 方法来揭示瘤胃纤毛虫物种多样性的全貌.

采用高通量测序技术在 3 个个体样品中共检测到 10 个属的瘤胃纤毛虫,同时还发现了一些未知属,表明在中国荷斯坦奶牛的瘤胃中可能还存在一些未知的瘤胃纤毛虫,或者有些瘤胃纤毛虫的 18S rDNA 序列尚未收录在 SILVA 数据库中.前人研究采用光学显微镜观察鉴定,在中国陕西的 5 头荷斯坦奶牛宿主中鉴定到 6~11 个属的瘤胃纤毛虫<sup>[41]</sup>,在加拿大的 4 头荷斯坦奶牛宿主中鉴定到 5 个属的瘤胃纤毛虫<sup>[42]</sup>,在日本的 125 头荷斯坦奶牛中共鉴定到 15 个属的瘤胃纤毛虫<sup>[43]</sup>,但其中的 *Oligoisotricha*、*Eodinium* 和 *Microcetus* 属目前已认为是非有效属<sup>[11]</sup>,因此,前人报道的荷斯坦奶牛宿主个体瘤胃内纤毛虫的属分布为 5~12 个不等.本研究高通量测序获得的 3 个荷斯坦奶牛宿主瘤胃内的十属纤毛虫除 *Blepharocorys* 外,其他 9 属都包含在前人报道的属中,表明高通量测序技术能够快速鉴定样品中瘤胃纤毛虫的物种多样性.

此外,本研究通过光学显微镜观察鉴定,在 3 个个体的混合样品中共鉴定到 12 个属的瘤胃纤毛虫(图 3(c)).比较高通量测序方法和光学显微镜观察方法检测到的瘤胃纤毛虫属的差异,发现真双毛属(*Eudiplodinium*)、硬甲属(*Ostrcodinium*)和前毛属(*Epidinium*)的代表物种在显微观察中被观察到,但在参考 SIL-



注:“Others”代表无对应分类类群.参考SILVA数据库对所有样品的OTUs在(a)属水平和(b)种水平水平进行分类;(c)光学显微镜观察鉴定3个个体样品的瘤胃纤毛虫在属水平上的相对丰度.

图3 基于高通量测序技术和光学显微镜观察鉴定的瘤胃纤毛虫种属分布  
Fig.3 The taxonomic distributions of rumen ciliates at different levels by HTS and microscopic observation

VA 数据库的高通量测序数据分析的 OTUs 中未被注释到(图 3(a)和图 3(c)).然而,比较高通量测序数据参考 SILVA 数据库和参考 PR<sup>2</sup> 数据库的 OTUs 的分类结果,发现 OTU11 在参考 PR<sup>2</sup> 数据库时被分类为真双毛属,但在参考 SILVA 数据库时被分类为后毛属(附录表 S1).类似地,OTU4、OTU27 和 OTU31 在参考 PR<sup>2</sup> 数据库时被分类为硬甲属,但在参考 SILVA 数据库时被分类为多甲属(附录表 S1).因此,光学显微镜观察到但未被高通量测序分析检测到的不一致的属可能是由于 SILVA 数据库中已有瘤胃纤毛虫序列的不准确的分类注释导致的.已有研究发现内毛属是中国黄牛和韩国奶牛瘤胃中最优势的原生动物<sup>[29-30]</sup>.不同饲养条件下,牛瘤胃中内毛属纤毛虫的比例为 60%至 97.3%<sup>[29]</sup>.本研究中,我们采用高通量测序分析和光学显微镜观察两种不同的研究方法都发现内毛属是中国荷斯坦奶牛瘤胃中最优势的类群.然而,在高通量测序分析中内毛属的相对丰度为 30.55%,而显微观察中内毛属的丰度高达约 90%.同一瘤胃液样品,当采用不同的研究方法时,其中内毛属的丰度差异明显,这可能是 PCR 扩增偏好于特定种类瘤胃纤毛虫或不同种类瘤胃纤毛虫的 rRNA 基因拷贝数变异的结果,与前人报道的结果相一致<sup>[27]</sup>.此外,高通量测序数据参考 PR<sup>2</sup> 数据库和 SILVA 数据库注释时,许多序列未被分类(图 2),还有一些序列被分类为“其他”属,表明当前公共数据库中收录的有限的瘤胃纤毛虫 18S rRNA 基因序列,也可能导致光学显微镜观察和基于 18S rRNA 基因分析的瘤胃纤毛虫种类不一致性.此外,一些 OTUs 分别参考 PR<sup>2</sup> 数据库和 SILVA 数据库时的分类命名不一致(附录表 S1),表明在使用高通量测序分析方法分析反刍动物瘤胃中的瘤胃纤毛虫物种多样性和不同个体间的变异性时,公共数据库中瘤胃纤毛虫 18S rRNA 基因序列的准确分类命名至关重要.因此,开发一种可靠的高通量测序方法来代替传统的光学显微镜观察以解读反刍动物瘤胃内瘤胃纤毛虫物种多样性目前具有挑战性,进一步补充和准确注释 18S rRNA 基因参考数据库中的瘤胃纤毛虫 18S rRNA 基因序列是必需的.

采用高通量测序技术,前人研究报道<sup>[19]</sup>在相同饲料条件下喂养的奶牛或同一农场饲养的家养牦牛的瘤胃细菌群落可能存在显著差异<sup>[25]</sup>.为了解析同一农场相同饲喂条件下中国荷斯坦奶牛不同个体样品的瘤胃纤毛虫的多样性和个体间的差异,我们比较了 3 个不同个体瘤胃液样品的瘤胃纤毛虫群落的 α 多样性指数,结果发现不同个体样品间瘤胃纤毛虫物种的丰富度没有显著差异,AC1 和 AC2 个体之间瘤胃纤毛虫物种的均匀度也没有差异,但 AC1 或 AC2 个体与 AC3 个体之间瘤胃纤毛虫物种的均匀度略有差异.此外,PCoA 和 ANOSIM 相似性分析结果显示,3 个个体样品的瘤胃纤毛虫的群落结构没有显著差异.因此,考虑到不同个体之间的均匀度差异较小,进一步研究可能需要使用更多的来自同一农场相同饲喂条件下不同个体的样本,以全面评估中国荷斯坦奶牛个体间瘤胃纤毛虫的变异性.

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.06.13.0001).

参 考 文 献

[1] NEWBOLD C J,DE LA FUENTE G,BELANCHE A,et al.The role of ciliate protozoa in the rumen[J].Frontiers in Microbiology,2015,6:1313.

[2] SYLVESTER J T,KARNATI S K R,YU Z T,et al.Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR[J].The Journal of Nutrition,2004,134(12):3378-3384.

[3] ANDERSEN T O,ALTSHULER I,VERA-PONCE DE LEÓN A,et al.Metabolic influence of core ciliates within the rumen microbiome[J].The ISME Journal,2023,17(7):1128-1140.

[4] LÓPEZ-GARCÍA A,SABORÍO-MONTERO A,GUTIÉRREZ-RIVAS M,et al.Fungal and ciliate protozoa are the main rumen microbes associated with methane emissions in dairy cattle[J].GigaScience,2022,11:giab088.

[5] FIRKINS J L,YU Z T,PARK T,et al.Extending Burk dehority's perspectives on the role of ciliate protozoa in the rumen[J].Frontiers in Microbiology,2020,11:123.

[6] LIN L M,XIE F,SUN D M,et al.Ruminal microbiome-host crosstalk stimulates the development of the ruminal epithelium in a lamb model[J].Microbiome,2019,7(1):83.

[7] 陆源鸿,余杨骏,姜传奇,等.显微观察中国荷斯坦牛瘤胃纤毛虫的物种多样性[J].动物学杂志,2022,57(3):383-391.

LU Y H,YU Y J,JIANG C Q,et al.Microscopic observation reveals ciliate species diversity in the rumen of Chinese Holstein cattle[J].Chinese Journal of Zoology,2022,57(3):383-391.

- [8] GÜRELLİ G, DAW A F O E. Endosymbiotic ciliated protozoan biota of dromedary camels and domestic cattle in Tunisia[J]. Zootaxa, 2020, 4859(3): 409-418.
- [9] BERBER B, GÜRELLİ G. Rumen ciliate fauna of domestic sheep in Kastamonu, Turkey, and infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *metadinium affine*, and *M. tauricum* (entodiniomorphida, Ophryoscolecidae)[J]. Zootaxa, 2019, 4695(6): 550-558.
- [10] WILLIAMS A G, COLEMAN G S. Metabolism of holotrich protozoa[M]. New York: Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience, 1992.
- [11] DEHORITY B A. Laboratory Manual for Classification and Morphology of Rumen Ciliate Protozoa[M]. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- [12] DEHORITY B A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(1): 182-185.
- [13] 邵继海, 陈杰锋, 胡婷. 林氏念珠藻对酸化稻田水稻产量和土壤细菌群落结构与功能的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2022, 50(6): 22-28.
- SHAO J H, CHEN J F, HU T. Effects of *Nostoc linckia* on rice grain yield and the structure and functions of bacterial community in acidified paddy soil[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2022, 50(6): 22-28.
- [14] DORIGO U, VOLATIER L, HUMBERT J F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities[J]. Water Research, 2005, 39(11): 2207-2218.
- [15] SIROHI S K, SINGH N, DAGAR S S, et al. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(5): 1135-1154.
- [16] REUTER J A, SPACEK D V, SNYDER M P. High-throughput sequencing technologies[J]. Molecular Cell, 2015, 58(4): 586-597.
- [17] SLATKO B E, GARDNER A F, AUSUBEL F M. Overview of next-generation sequencing technologies[J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2018, 122(1): e59.
- [18] WANG L, WU D, YAN T, et al. The impact of rumen cannulation on the microbial community of goat rumens as measured using 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102(1): 175-183.
- [19] GUO W, LI Y, WANG L Z, et al. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology[J]. Anaerobe, 2015, 34: 74-79.
- [20] STEWART R D, AUFFRET M D, WARR A, et al. Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 870.
- [21] STEWART R D, AUFFRET M D, WARR A, et al. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 953-961.
- [22] WILKINSON T, KORIR D, OGUGO M, et al. 1200 high-quality metagenome-assembled genomes from the rumen of African cattle and their relevance in the context of sub-optimal feeding[J]. Genome Biology, 2020, 21(1): 229.
- [23] HESS M, SCZYRBA A, EGAN R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. Science, 2011, 331(6016): 463-467.
- [24] CHEN F M, CHENG G M, XU Y L, et al. Rumen microbiota distribution analyzed by high-throughput sequencing after oral doxycycline administration in beef cattle[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 251.
- [25] JAMI E, MIZRAHI I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33306.
- [26] TYMENSEN L, BARKLEY C, MCALLISTER T A. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(1): 1-6.
- [27] KITTELMANN S, DEVENTE S R, KIRK M R, et al. Phylogeny of intestinal ciliates, including Charonina ventriculi, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2433-2444.
- [28] REGENSBOGENOVA M, PRISTAS P, JAVORSKY P, et al. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(2): 144-147.
- [29] LENG J, ZHONG X, ZHU R J, et al. Assessment of protozoa in Yunnan Yellow cattle rumen based on the 18S rRNA sequences[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 577-585.
- [30] SHIN E C, CHO K M, LIM W J, et al. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(2): 378-383.
- [31] 徐勤辉, 何金英, 王宇嘉, 等. 反刍动物瘤胃中主要厌氧真核微生物尖尾内毛虫的体外培养方法[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2554-2565.
- XU Q H, HE J Y, WANG Y J, et al. An in vitro cultivation method for the predominant anaerobic eukaryotic microorganism *Entodinium caudatum* in the rumen of ruminants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2554-2565.
- [32] KITTELMANN S, SEEDORF H, WALTERS W A, et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e47879.
- [33] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet Journal, 2011, 17(1): 10.

[34] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of Chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.

[35] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.

[36] GUILLOU L, BACHAR D, AUDIC S, et al. The protist ribosomal reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): D597-D604.

[37] QUAIST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): D590-D596.

[38] 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.

[39] CLARKE K R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure[J]. *Australian Journal of Ecology*, 1993, 18(1): 117-143.

[40] HACKMANN T J, SEN A, FIRKINS J L. Culture techniques for ciliate protozoa from the rumen: recent advances and persistent challenges[J]. *Anaerobe*, 2024, 87: 102865.

[41] LI Z J, WANG X N, ZHANG Y, et al. Genomic insights into the phylogeny and biomass-degrading enzymes of rumen ciliates[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(12): 2775-2787.

[42] BENCHAA R, MCALLISTER T A, CHOUINARD P Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts 1[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(12): 4765-4777.

[43] ITO A, IMAI S, OGIMOTO K. Rumen ciliate composition and diversity of Japanese beef black cattle in comparison with those of Holstein-Friesian cattle[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1994, 56(4): 707-714.

High-throughput sequencing deciphering diversity and individual variability of rumen ciliate protozoa in Chinese Holstein dairy cows

He Jinying<sup>1</sup>, Xu Qinhuai<sup>1</sup>, Wang Yujia<sup>1</sup>, Jiang Yixi<sup>1</sup>, Huang Yifei<sup>1</sup>, Li Man<sup>1</sup>, Xiong Jie<sup>2</sup>, Feng Jinmei<sup>1</sup>

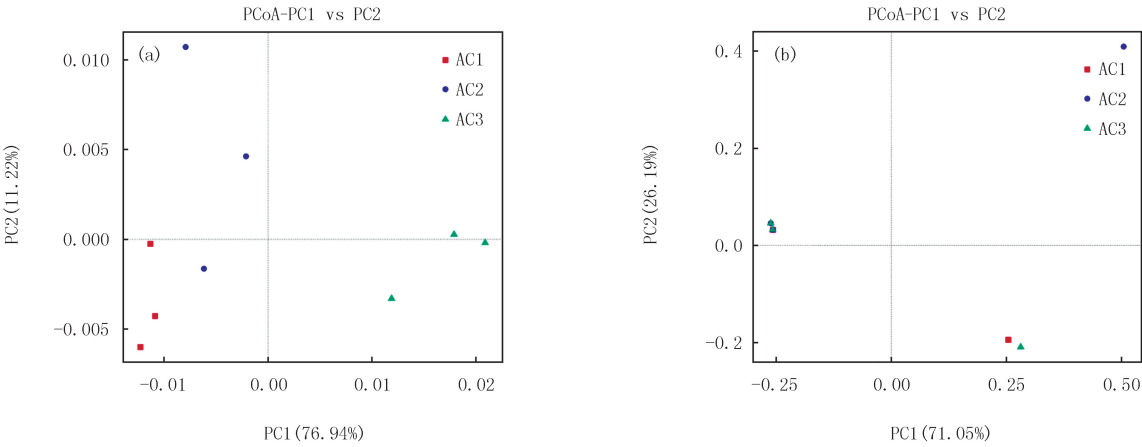
(1. Department of Pathogenic Biology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; 2. Institute of Hydrobiology; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Rumen ciliates, the dominant protozoa in rumen, are integral part of the rumen eco-system and important to the rumen ecosystem and their host animal physiology. However, the full spectrum of rumen ciliate community diversity and individual variability in domesticated ruminant rumen is still elusive. Here, using 18S rRNA gene high-throughput sequencing technique, we deciphered the rumen ciliate community diversity and individual variability in Chinese Holstein dairy cow rumen. The special primer set of the ciliate 18S rRNA gene were used. A total of 721 250 high-quality effective sequences were obtained after sequence filtering and chimera removal, and 38 operational taxonomic units(OTUs) were obtained at 97% sequence identity. The differences in alpha diversity indices, including Chao1, ACE, Shannon, and Simpson indices, among samples from different individuals were not statistically significant. Taxonomy assignments revealed that the identified OTUs were assigned to the Litostomatea class Trichostomatia subclass. At the genus level, ten genera were assigned, of which *Entodinium* is the most predominant one, and a few unclassified and unidentified rumen ciliates were also detected. No significant different of rumen ciliate community diversity among different individuals fed on the same diet on the same farm, while little evenness difference was found between different individuals. This work would provide a reference basis for further study on metagenome analyses and integrated taxonomy of rumen ciliates in the future.

**Keywords:** rumen ciliates; protozoa; diversity; 18S rRNA gene sequencing; taxonomy

[责任编辑 刘洋 赵晓华]

附 录



PCoA图基于加权(a)和未加权(b)的UniFrac距离矩阵构建。

图S1 相同饲喂条件下不同个体样品中瘤胃纤毛虫群落结构的主坐标分析(PcoA)

Fig.S1 PCoA plot of rumen ciliate community structures in rumen samples of different individuals feeding on the same farm

表 S1 参考 PR<sup>2</sup> 数据库和 SILVA 数据库分类注释不一致的 OTUs

Tab. S1 OTUs with inconsistent taxonomical assignments when referring to PR<sup>2</sup> database and SILVA database

| OUT 编号 | 参考 PR <sup>2</sup> 数据库的物种分类                                                                                                 | 参考 SILVA 数据库的物种分类                                                                                                          |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| OTU_11 | k_Eukaryota;p_Alveolata;c_Litostomatea;o_Trichostomatia;<br>f_Ophryoscolecidae;g_Eudiplodinium;<br>s_Eudiplodinium_maggii   | k_Eukaryota;p_Ciliophora;c_Litostomatea;<br>o_unidentified_Litostomatea;<br>f_unidentified_Litostomatea;g_Metadinium;s_?   |
| OTU_4  | k_Eukaryota;p_Alveolata;c_Litostomatea;o_Trichostomatia;<br>f_Ophryoscolecidae;g_Ostracodinium;<br>s_Ostracodinium_gracile  | k_Eukaryota;p_Ciliophora;c_Litostomatea;<br>o_unidentified_Litostomatea;<br>f_unidentified_Litostomatea;g_Polyplastron;s_? |
| OTU_27 | k_Eukaryota;p_Alveolata;c_Litostomatea;<br>o_Trichostomatia;f_Ophryoscolecidae;<br>g_Ostracodinium;s_Ostracodinium_dentatum | k_Eukaryota;p_Ciliophora;c_Litostomatea;<br>o_unidentified_Litostomatea;<br>f_unidentified_Litostomatea;g_Polyplastron;s_? |
| OTU_31 | k_Eukaryota;p_Alveolata;c_Litostomatea;<br>o_Trichostomatia;f_Ophryoscolecidae;<br>g_Ostracodinium;s_Ostracodinium_dentatum | k_Eukaryota;p_Ciliophora;c_Litostomatea;<br>o_unidentified_Litostomatea;<br>f_unidentified_Litostomatea;g_Polyplastron;s_? |

注:k\_、p\_、c\_、o\_、f\_、g\_、s\_后面分别是界、门、纲、目、科、属、种分类阶元的分类信息,s\_? 代表种名未知。