

DOI: 10.20103/j.stxb.202405111070

张丽娇, 迪拉拉·托留, 徐文轩, 吴永杰, 汪沐阳, 杨维康. 帕米尔盘羊食性与肠道微生物季节变化特征. 生态学报, 2025, 45(2): 629-643.

Zhang L J, Tuoliu Dilala, Xu W X, Wu Y J, Wang M Y, Yang W K. The seasonal variation characteristics of diet and gut microbiota in Marco Polo sheep (*Ovis ammon polii*). Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(2): 629-643.

帕米尔盘羊食性与肠道微生物季节变化特征

张丽娇^{1,2,3,4}, 迪拉拉·托留^{1,2,3}, 徐文轩^{1,2,3}, 吴永杰⁵, 汪沐阳^{1,2,3}, 杨维康^{1,2,3,*}

1 中国科学院新疆生态与地理研究所, 干旱区生态安全与可持续发展重点实验室, 乌鲁木齐 830011

2 中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆干旱区生物多样性保育与应用重点实验室, 乌鲁木齐 830011

3 中国-塔吉克斯坦生物资源保育与利用联合实验室, 乌鲁木齐 830011

4 中国科学院大学, 北京 100049

5 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065

摘要: 肠道微生物对宿主代谢和环境适应有重要影响, 其种类组成主要受宿主食物组成与进化遗传的影响。开展野生动物肠道微生物和食性研究有助于揭示肠道微生物如何提高宿主对环境胁迫的适应能力, 可为濒危动物保护提供指导。采集暖季与冷季各 12 份帕米尔盘羊 (*Ovis ammon polii*) 的新鲜粪样, 利用 DNA 宏条形码技术和 16S rRNA 测序技术, 分析帕米尔盘羊冷暖季的食物与肠道微生物组成及其季节性差异。结果表明帕米尔盘羊共采食 36 科 57 属植物, 其冷暖季食物组成具有显著差异, 但主要食物均为蔷薇科 (Rosaceae) 与苋科 (Amaranthaceae) 植物。帕米尔盘羊冷季营养生态位宽度为 3.18, 暖季为 2.94。该种肠道微生物 α 多样性与 β 多样性均呈现显著的季节差异, 多种食物与肠道微生物丰度呈现显著相关性。帕米尔盘羊肠道微生物随着其食物组成的季节性变化而变化。肠道微生物功能预测显示, 宿主在食物缺乏的冷季酯类化合物的生物合成、蛋白质消化与吸收代谢相关的功能基因的相对丰度显著增加, 这有助于宿主更有效地利用氮和能量沉积, 提高了盘羊在严酷冬季的适应能力。研究结果有助于深入理解高原生态系统野生动物与其肠道微生物与之间的相互作用关系, 为濒危物种保护管理提供科学依据。

关键词: 帕米尔盘羊; DNA 宏条形码技术; 16S rRNA; 食性; 肠道微生物; 新疆塔什库尔干野生动物自然保护区

The seasonal variation characteristics of diet and gut microbiota in Marco Polo sheep (*Ovis ammon polii*)

ZHANG Lijiao^{1,2,3,4}, TUOLIU Dilala^{1,2,3}, XU Wenxuan^{1,2,3}, WU Yongjie⁵, WANG Muyang^{1,2,3}, YANG Weikang^{1,2,3,*}

1 State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Key Laboratory of Ecological Safety and Sustainable Development in Arid Lands, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Ürümqi 830011, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Biodiversity Conservation and Application in Arid Lands, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Ürümqi 830011, China

3 Sino-Tajikistan Joint Laboratory for Conservation and Utilization of Biological Resources, Ürümqi 830011, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

5 Key Laboratory of Bioresources and Ecoenvironment (Ministry of Education), College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: The gut microbiota is a critical component in the modulation of host metabolism and the adaptation to environmental conditions. Its composition is significantly influenced by dietary intake and evolutionary genetics, making it a key factor in the survival and health of various species. This study delves into the gut microbiota and dietary habits of the

基金项目: 第二次青藏高原综合科学考察研究项目 (2019QZKK0501); 中国科学院西部青年学者项目 (2021-XBQNXX-014); 第三次新疆综合科学考察项目 (2022xjkk0205)

收稿日期: 2024-05-11; **网络出版日期:** 2024-10-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangwk@ms.xjb.ac.cn

Marco Polo sheep (*Ovis ammon polii*), across different seasons. The aim is to elucidate how the microbiota enhances the host's resilience to environmental stressors, thereby informing conservation strategies for endangered species. To achieve this, we collected 12 fresh fecal samples from the Marco Polo sheep during both the warm and cold seasons. Employing DNA metabarcoding and 16S rRNA sequencing, we comprehensively analyzed their dietary and gut microbial profiles. This approach allowed us to reveal the seasonal dynamics and understand how these dynamics affect the sheep's ability to adapt to varying environmental conditions. Our analysis reveals that the Marco Polo sheep have a wide dietary spectrum, consuming plants from 36 families and 57 genera. A notable difference in dietary composition was observed between the warm and cold seasons, with plants from the Rosaceae and Amaranthaceae families consistently predominating in their diet across both seasons. This consistency suggests a preference or necessity driven by nutritional needs or availability. The calculated nutritional niche width was 3.18 for the cold season and 2.94 for the warm season, indicating a broader nutritional niche in the colder period. This broader niche may reflect the sheep's adaptive foraging strategies in response to the scarcity of food resources during winter. Such strategies are essential for their survival, as they must maximize the utilization of available resources to maintain their health and energy levels. Significant seasonal variations were observed in both the α and β diversity of the gut microbiota, with strong correlations between dietary abundance and gut microbial composition. The gut microbiota of the Marco Polo sheep showed marked seasonal fluctuations that corresponded with dietary shifts. This synchronization suggests a dynamic relationship between diet and gut microbiota, where changes in diet directly influence the microbial community. Functional predictions of the gut microbiome indicated a substantial increase in the relative abundance of genes associated with ester compound biosynthesis, protein digestion, and metabolism during the cold season, a time of food scarcity. This adaptation likely facilitates enhanced nitrogen utilization and energy storage, improving the sheep's ability to withstand the harsh winter conditions. The ability to adapt their gut microbiota in response to dietary changes is a critical survival mechanism for the Marco Polo sheep. These findings deepen our understanding of the complex interactions between gut microbiota and their hosts in Plateau ecosystems. The insights gained from this study into the dietary and microbial strategies employed by the Marco Polo sheep to increase their resilience against environmental challenges are highly relevant for the conservation of endangered species in the context of environmental change.

Key Words: Marco Polo sheep; DNA metabarcoding; 16S rRNA; diet; gut microbial; Taxkorgan Nature Reserve in Xinjiang

灵活选择食物是野生动物适应环境胁迫的生存策略^[1], 营养生态位扩张是野生动物对季节和环境变化的积极适应^[2]。食物是影响肠道微生物组成和功能差异的主要因素之一, 食物改变影响甚至决定动物肠道微生物组成, 导致其季节性变化^[3]。同时, 肠道微生物能显著影响宿主的食物消化和营养吸收, 同时还能合成宿主生命活动所需的关键物质^[4]。在食物缺乏或环境恶劣的条件下, 肠道微生物能够提高宿主的能量获取, 起到补偿作用^[5]。已有研究显示随食物变化, 哺乳动物肠道微生物组成出现季节性变化。这在小林姬鼠 (*Apodemus sylvaticus*)^[3]、北美红松鼠 (*Tamiasciurus hudsonicus*)^[6]、大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)^[7]、黑猩猩 (*Pan troglodytes*)^[8] 及美洲野牛 (*Bison bison*)^[9] 等动物的肠道微生物研究中得到了证实。在这些研究中, 肠道微生物的组成变化有助于提高宿主的食物消化效率, 从而满足宿主对能量和营养的需求。有研究表明, 动物通过调整肠道微生物“代谢”水平来维持机体的基本消耗, 如冬季鹅喉羚 (*Gazella subgutturosa*) 促进宿主糖代谢的拟杆菌相对丰度显著增加以应对寒冷的气候与食物资源的短缺^[10]。放牧牦牛 (*Bos grunniens*) 冷季的两种代表肠道微生物功能预测显示其介导牦牛精氨酸和脂肪酸的生物合成途径, 帮助宿主在寒冷季节更有效地利用氮和进行能量沉积^[11]。尽管现有研究已揭示了肠道微生物与宿主之间具有密切联系, 但针对高海拔地区哺乳动物季节性饮食如何影响其肠道微生物群落, 以及两者的相互作用如何帮助宿主适应极端环境条件的研究仍相对匮乏^[11]。本研究聚焦于帕米尔高原的旗舰物种帕米尔盘羊, 通过研究其食性与肠道微生物的

季节变化特征,旨在深入理解哺乳动物如何适应高海拔和极端环境变化。此项研究不仅有助于深化对高海拔生态系统中肠道微生物功能的认识,而且可为保护生物学和生态学领域提供新的研究视角和科学基础。

帕米尔高原是“世界屋脊”青藏高原向西的延伸,是世界“第三极”的重要组成部分,具有温度变化剧烈、含氧量低、食物资源匮乏等系列特征。帕米尔盘羊(又名马可波罗盘羊)是盘羊(*Ovis ammon*)的一个亚种,仅分布于塔吉克斯坦、阿富汗、巴基斯坦、吉尔吉斯斯坦以及中国5国接壤的帕米尔高原^[12-13],是帕米尔高原的特有和旗舰物种,国家二级重点保护野生动物,中国脊椎动物红色名录易危物种^[14-17]。以往的研究关注其种群分布与数量^[18-22]、同性聚群和种群结构^[23-25]、采食地选择^[26]、生境适宜性与生态廊道^[27]和人类活动影响^[28]等,关于其食性和肠道微生物组成及其季节性变化特征尚未见报道。

研究有蹄类动物食性,传统的分析方法是粪便显微分析。但该方法耗时耗力,对镜检者的经验要求较高,加之不同植物的消化程度导致可供辨认的植物表皮细胞存在一定偏差^[29]。伴随新技术的发展,DNA宏条形码技术(DNA metabarcoding)和高通量测序(High-throughput sequencing, HTS)等分子生物学技术成为野生动物食性和肠道微生物研究的主流方法^[30-31],已被广泛应用于有蹄类动物相关研究^[32-34]。本研究采用DNA宏条形码技术和16S rRNA测序技术,全面分析帕米尔盘羊在冷暖季节的食性和肠道微生物组成及其季节性变化。旨在揭示食性对肠道微生物群的影响及两者之间的关联,为制定帕米尔盘羊的有效保护措施提供科学依据。

1 研究方法

1.1 研究区域

研究区位于新疆塔什库尔干野生动物自然保护区(以下简称保护区)(图1)。该保护区位于新疆喀什地区塔什库尔干塔吉克自治县南部(北纬35°38'—37°30',东经74°30'—77°00'),与巴基斯坦、阿富汗和塔吉克斯坦三国接壤,总面积为15863 km²。保护区是我国唯一以帕米尔盘羊为主要保护对象的自然保护区^[35],也是北山羊(*Capra sibirica*)、岩羊(*Pseudois nayaur*)、雪豹(*Panthera uncia*)等濒危哺乳动物的集中分布地。保护区内平均海拔4000 m以上,最高8611 m,最低2200 m。区内河谷纵横,地形复杂,总地势从西南向东北倾斜。空气稀薄、日照充足,年均温3℃,无霜期70 d,平均降水量不足70 mm,蒸发量高达2571 mm,属大陆性高原干旱荒漠气候^[26, 36]。

保护区具有丰富的野生动植物资源。植物种类组成以紫花针茅(*Stipa purpurea*)、青藏薹草(*Carex moorcroftii*)、合头草(*Sympegma regelii*)、垫状驼绒藜(*Ceratoides compacta*)、小叶忍冬(*Lonicera microphylla*)、中麻黄(*Ephedra intermedia*)、南疆点地梅(*Androsace flavescens*)等为主^[19]。分布有雪豹、胡兀鹫(*Gypaetus barbatus*)、金雕(*Aquila chrysaetos*)等近10种国家一级重点保护野生动物,帕米尔盘羊、岩羊、豺(*Cuon alpinus*)、藏雪鸡(*Tetraogallus tibetanus*)、暗腹雪鸡(*T. himalayensis*)、秃鹫(*Aegypius monachus*)等数十种国家二级重点保护野生动物^[15]。

1.2 粪便样品采集和处理

野外调查时采用样线法寻找帕米尔盘羊。发现目标物种后,首先使用单筒望远镜观察,并记录群体信息,待群中个体排便后,步行前往群体所在位置,寻找采集新鲜粪样。为避免采集到同一个体的粪便,故不对同一

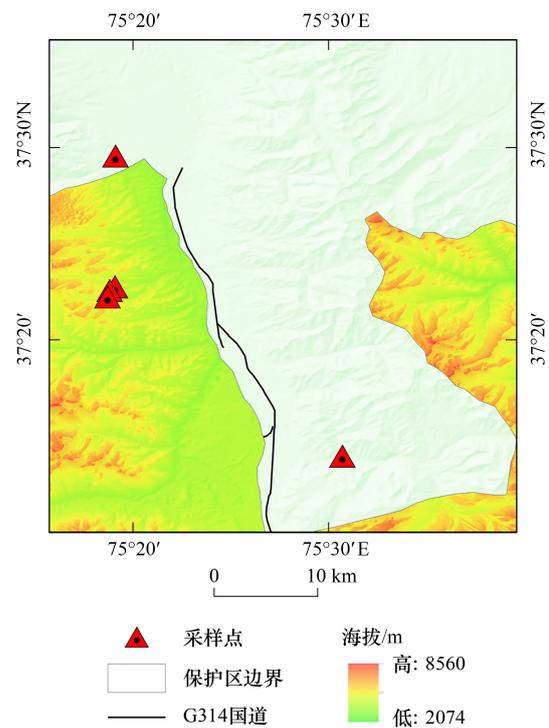


图1 研究区域图

Fig.1 Map of the study area

采样点进行重复采样。采集粪便样品时,使用一次性竹筷将粪便放入冻存管中。每份样品编号放入干冰桶中,带回实验室后转移至 -80°C 冰箱长期保存,直至提取 DNA。通过上述方法,于 2023 年 8 月和 11 月分别采集帕米尔盘羊暖季和冷季粪样各 12 份。

在帕米尔盘羊生境中采集所有植物的茎叶材料,放入信封袋中干燥保存。采集植物材料时,对整个植株及植物分布环境拍照,为后续植物鉴定提供辅助材料。

1.3 食性 DNA 宏条形码分析

对冷暖季共 24 份粪样利用十六烷基三甲基溴化铵法 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)^[37] 提取粪便 DNA。以抽提的 DNA 为模板,选用引物 Z1aF (5'-ATGTCACCACCAACAGAGA-CTAAAGC-3') 和 hp2R (5'-CGTCCTTTGTAACGATCAAG-3') 对食物叶绿体 rbcL 区进行 PCR 扩增^[34,38]。所有 PCR 混合液加入 15 μL Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs)、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物和 10 ng 基因组 DNA 模板,在 98°C 下进行 1 min 的第一次变性,然后在 98°C (10s)、 50°C (30s) 和 72°C (30s) 下进行 30 次循环,最后在 72°C 下保持 5 min。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;对检测合格的 PCR 产物进行磁珠纯化,采用酶标定量,根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并回收目的条带。PCR 产物纯化后,再经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化等步骤完成整个文库制备工作。构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 Illumina 高通量测序平台 NovaSeq6000 进行 PE250 双末端测序^[39]。

测序完成后,根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据。截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH (v 1.2.11)^[40],对每个样本的 reads 进行拼接。随后使用 Cutadapt 软件匹配反向引物序列并剪切掉余下的序列,以防止其对后续分析造成干扰。使用 fastp 软件 (v 0.23.1) 对拼接得到的数据经过严格的过滤处理得到高质量的数据^[41]。高质量序列通过与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列,并最终去除其中的嵌合体序列,得到最终的有效数据^[42]。对以上得到的有效数据,使用 QIIME2 (v 202202) 软件中的 DADA2 模块进行降噪,获得最终的扩增子序列变异数量 (Amplicon Sequence Variants, ASVs),类似以 100% 相似度聚类的可操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU) 以及特征表^[7]。按照最小样本序列数对样本序列抽平。

采用 BLAST 局域比对与人为比对的注释方法^[43-44]。具体方法如下:从 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载 NT 数据库,然后使用 BLAST+ (2.15.0) 的 blastn 程序将获得的 ASV 与数据库进行比对,获得每个 ASV 的物种注释。此外,为了提高结果的可靠性,参照湛振杰等^[45]提出的注释规则,结合本地物种信息对序列进一步人工比对。

1.4 肠道微生物 16S rRNA 扩增子分析

以抽提的 24 份粪便 DNA 为模板,选用引物 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3—V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 产物同样由北京诺禾致源科技股份有限公司在 Illumina 高通量测序平台上进行双末端测序。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。以 100% 相似度聚类获得的 ASVs,与 Silva 数据库 (<http://www.arb-silva.de>) 比较进行物种注释,去除质体、叶绿体与线粒体序列。按照最小样本序列数对样本序列抽平。根据样本 ASV 中对应的功能基因信息,利用 PICRUSt 软件标准化后的 ASV 丰度表与 Greengene 数据库比对,获得相应的 KEGG Orthology (KO) 信息,再比对 KEGG 数据库解析到 Pathway level 3 功能信息,从而得到功能丰度谱,对肠道微生物作出功能类群组成和丰度预测^[46]。

1.5 统计分析

计算绘制 Venn 图展现食性与肠道微生物冷暖季共有和独有 ASVs 的数量,同时绘制稀疏曲线以评估样品数是否足够代表帕米尔盘羊食性与肠道微生物结果。分别在科、属、种水平统计全部样品中的食物组成及每种食物被取食频率,以及门、科、属水平的肠道微生物组成及相对丰度。根据 Levins 公式^[47] 计算食物生态

位宽度指数(B):

$$B = 1 / \sum (P_i)^2 \quad (1)$$

式中, P_i 为食物 i 在帕米尔盘羊食物中出现的频率。 B 值越大,表明帕米尔盘羊的食物生态位就越宽。

对帕米尔盘羊冷暖季的食物与肠道微生物组成进行深入分析。首先,计算 α 多样性指数,包括 Shannon-Wiener 指数、Simpson's diversity 指数和 Pielou's 均匀度指数。接着,使用 Mann-Whitney U 检验比较不同季节间食物组成与肠道微生物组成的 α 多样性差异。进一步地,采用主坐标分析 (principalco-ordinates analysis, PCoA) 法分析不同季节食物组成与肠道微生物组成的 β 多样性分析 (“vegan”包);同时基于 Bray-Curtis 相似性距离算法,采用相似性分析 (Analysis of similarities, ANOSIM) 和 Adonis 分析 (置换多因素方差分析, Permutational MANOVA) 进行食物组成与肠道微生物组成的季节差异性检验 (“vegan”包, anosim function)。为识别帕米尔盘羊是否存在季节差异的关键食物和肠道微生物物种 (即关键生物标记物),通过在线平台对两季节间帕米尔盘羊食物和肠道微生物序列的相对丰度进行线性判别分析 (LEfSe, LDA = 2.0)^[48-49]。此外,使用 psych 包确定肠道微生物和食物组成之间的 Spearman 非参数相关性^[50]。最后,使用 STAMP 软件进行肠道微生物功能类群与丰度预测的季节差异比较。涉及软件包的数据分析和绘图均在 R (v 4.3.0) 中实现 (R Core Team, 2023)。

2 结果与分析

2.1 测序质量与 ASV 分析

基于 Illumina 高通量测序技术和食物 DNA 宏条形码分析方法,从 24 个帕米尔盘羊粪便样本共获得有效序列 221959 条,每个样本的平均有效序列为 92482 条。以 100% 相似度聚类得到 1024 个 ASVs。其中冷季和暖季共有 ASVs 108 个,冷季独有的 ASVs 545 个,暖季独有的 ASVs 371 个 (图 2)。

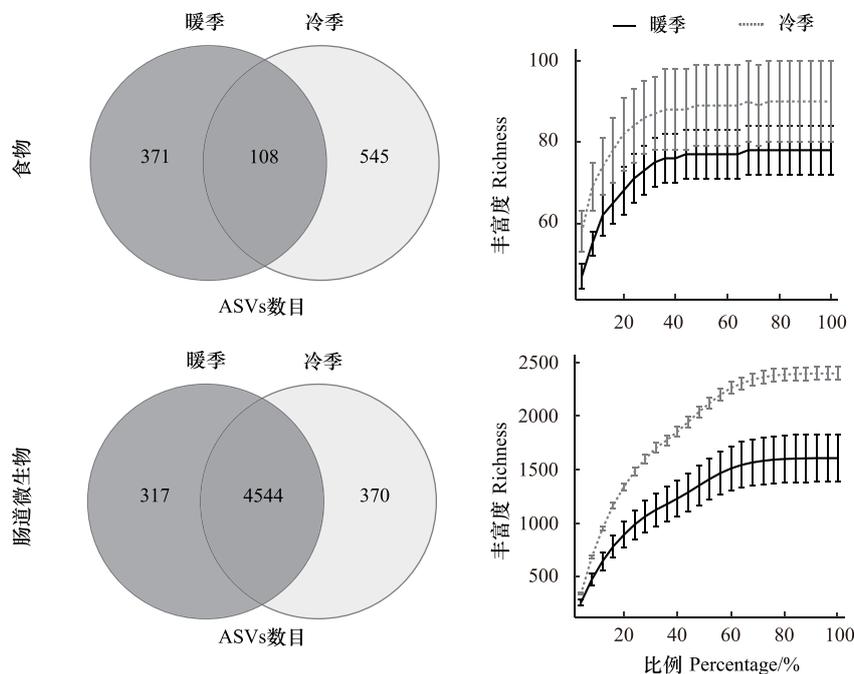


图 2 食物与肠道微生物 ASVs 数的韦恩图和丰富度稀释曲线

Fig.2 Venn diagram of ASVs and rarefaction curve of richness of diet and gut microbial

ASVs: 扩增子序列变异数量 Amplicon sequence variants

采用肠道微生物 16S rRNA 测序法从 24 个帕米尔盘羊粪便样本共获得有效序列 1246937 条,每个样本的平均有效序列为 51956 条。以 100% 相似度聚类得到 5231 个 ASVs,冷季和暖季共有 ASVs 4544 个,冷季独有

ASVs 370 个,暖季独有 ASVs 317 个(图 2)。稀释曲线结果表明,测序深度已基本覆盖样品中所有食物与肠道微生物(图 2)。

2.2 帕米尔盘羊冷暖季食物与肠道微生物组成

结合本地物种名录在帕米尔盘羊粪样中共鉴定出 36 科 57 属植物,其中有 40 种植物鉴定到了种水平(附表 1)。在科水平,蔷薇科(Rosaceae)分别占冷季和暖季食谱的 32.29% 和 64.56%,为帕米尔盘羊主要食物。冷季食物其次是苋科(Amaranthaceae, 20.71%)、麻黄科(Ephedraceae, 16.58%)、菊科(Asteraceae, 14.56%)、石竹科(Caryophyllaceae, 4.29%)、禾本科(Poaceae, 3.43%)等植物,暖季食物其次是苋科(8.01%)、菊科(7.46%)、蓼科(Polygonaceae, 4.93%)、禾本科(4.11%)、石竹科(3.05%)等植物(图 3)。帕米尔盘羊的营养生态位宽度冷季为 3.18,暖季为 2.94。

肠道微生物 16S rRNA 测序分析结果显示,帕米尔盘羊肠道微生物分别属于 16 门、28 纲、41 目、76 科和 189 属。在门水平,冷季的优势菌门(相对丰度>1%)分别是厚壁菌门(Firmicutes)(56.41%)、拟杆菌门(Bacteroidetes)(33.29%)、疣微菌门(Verrucomicrobia)(4.90%)和广古菌门(Euryarchaeota)(1.58%)。暖季的优势菌门分别是厚壁菌门(56.92%)、拟杆菌门(27.60%)、放线菌门(Actinobacteria, 6.38%)、疣微菌门(4.66%)、广古菌门(1.94%)和变形菌门(Proteobacteria, 1.07%)。

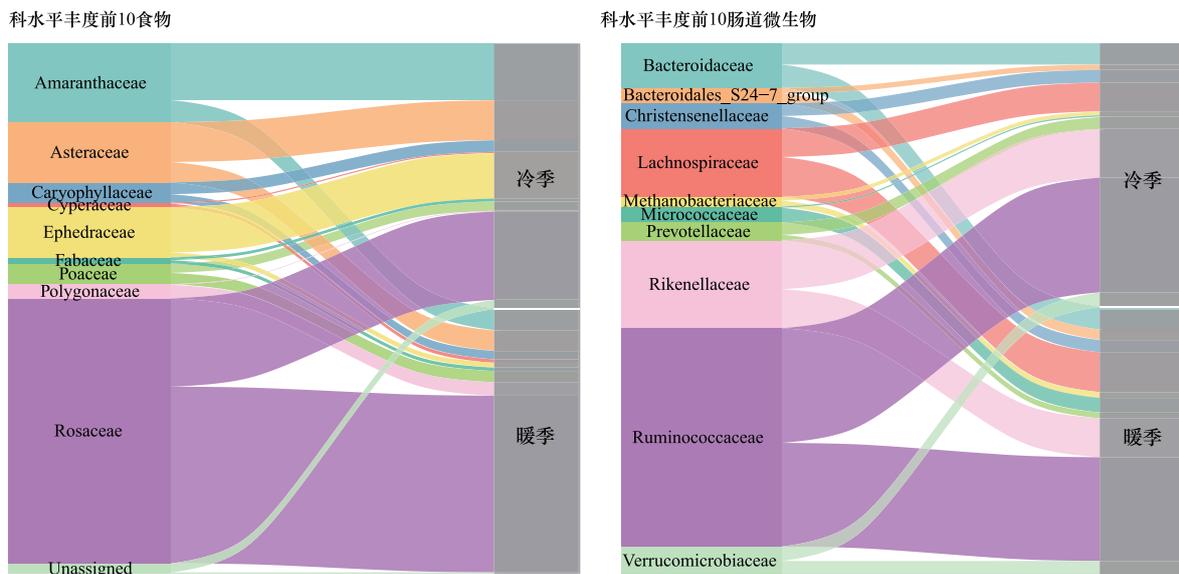


图 3 暖季与冷季帕米尔盘羊食物与肠道微生物组成成分分析

Fig.3 Analyses of diet and gut microbial composition of Marco Polo sheep in warm and cold seasons

在科水平,冷季和暖季相对丰度最高的 3 个优势菌科均为瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、毛螺球菌科(Lachnospiraceae)、理研菌科(Rikenellaceae),分别占冷季菌科的 38.94%、9.76%、16.55%,暖季菌科的 35.21%、13.52%、13.23%(图 3)。在属水平,冷暖季相对丰度最高的 3 个优势菌属均为瘤胃球菌科 UCG-005 属(Ruminococcaceae_UCG-005)、未分类 Unassigned、理研菌科 RC9 属(Rikenellaceae_RC9_gut_group),分别占冷季菌属的 13.28%、10.39%和 12.79%,暖季菌属的 12.54%、12.53%和 7.99%。未分类的细菌占比较高,显示帕米尔盘羊的肠道内可能会有一些尚未被记录的细菌类群。

2.3 食性与肠道微生物季节差异

食物 α 多样性显示,帕米尔盘羊食物多样性 Shannon-Wiener 指数、Simpson's diversity 指数和 Pielou's 均匀度指数均无显著季节差异(图 4)。ANOSIM 和 Adonis 检验分析表明冷暖季帕米尔盘羊食物组成差异显著($P < 0.01$)。主坐标分析(PCoA)结果显示冷暖季帕米尔盘羊由于食物组成相似而相互重叠,但冷季帕米尔盘羊粪便样品分布更加离散,说明冷季各粪便样品所含食物种类和序列丰度差异较大,而暖季时各粪便样品

间差异较小,因而空间分布更加聚集(图4)。

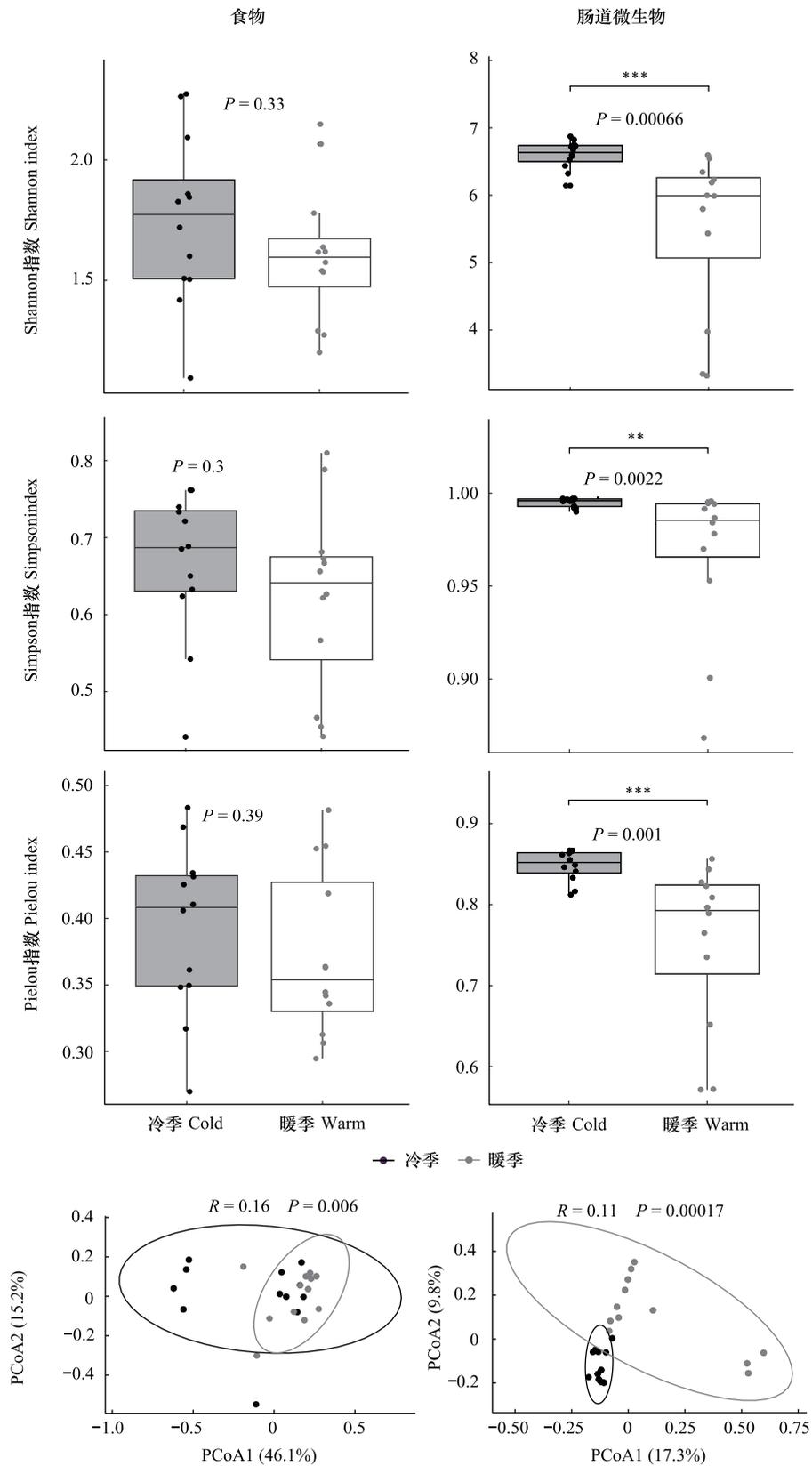


图4 暖季与冷季帕米尔盘羊食物与肠道微生物 α 多样性与 β 多样性分析

Fig.4 Analysis of α diversity and β diversity of diet and gut microbial in Marco Polo sheep during warm and cold seasons

* $P < 0.05$ (Wilcoxon Rank Sum Test), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

肠道微生物 α 多样性计算结果显示,冷季帕米尔盘羊肠道微生物多样性 Shannon-Wiener 指数、Simpson' s diversity 指数和 Pielou' s 均匀度指数均显著高于暖季 (图 4)。ANOSIM 和 Adonis 检验分析表明冷暖季帕米尔盘羊肠道微生物组成差异显著 ($P < 0.001$)。主坐标分析 (PCoA) 结果显示,冷暖季帕米尔盘羊肠道微生物呈现明显分离趋势,季节内有明显的聚类说明个体间差异很小 (图 4)。

LEfSe 分析 ($LDA > 2, P < 0.05$) 显示,冷季相对丰度显著高于暖季的大宗食物有麻黄科、麻黄属 (*Ephedra*) (图 5);暖季相对丰度显著高于冷季的食物包括科水平的蔷薇科、蓼科、报春花科 (*Primulaceae*)、牻牛儿苗科 (*Geraniaceae*)、豆科 (*Fabaceae*) 和景天科 (*Crassulaceae*),属水平的委陵菜属 (*Potentilla*)、大黄属 (*Rheum*)、披碱草属 (*Elymus*)、老鹳草属 (*Geranium*)、棘豆属 (*Oxytropis*)、沼委陵菜属 (*Comarum*) 和红景天属 (*Rhodiola*)。

基于肠道微生物科与属水平的 LEfSe 分析 ($LDA > 2, P < 0.05$) 显示,冷季丰度明显高于暖季的肠道微生物类群包括拟杆菌门的普雷沃菌科和该科的 UCG_004 属 (*Prevotellaceae_UCG_004*) 以及厚壁菌门的瘤胃球菌科的 UCG_002 属 (*Ruminococcaceae_UCG_002*)、毛螺球菌科的罗氏菌属 (*Roseburia*) 和 *Lachnoclostridium_10* 属、胺基酸球菌科 (*Acidaminococcaceae*) 和该科的考拉杆菌属 (*Phascolarctobacterium*)。暖季丰度明显高于冷季的肠道微生物类群包括拟杆菌门的 *Bacteroidales_S24_7_group* 科和该科的未分类属,以及广古菌门的产甲烷菌科 (*Methanobacteriaceae*) 的甲烷球形菌属 (*Methanosphaera*) (图 5)。

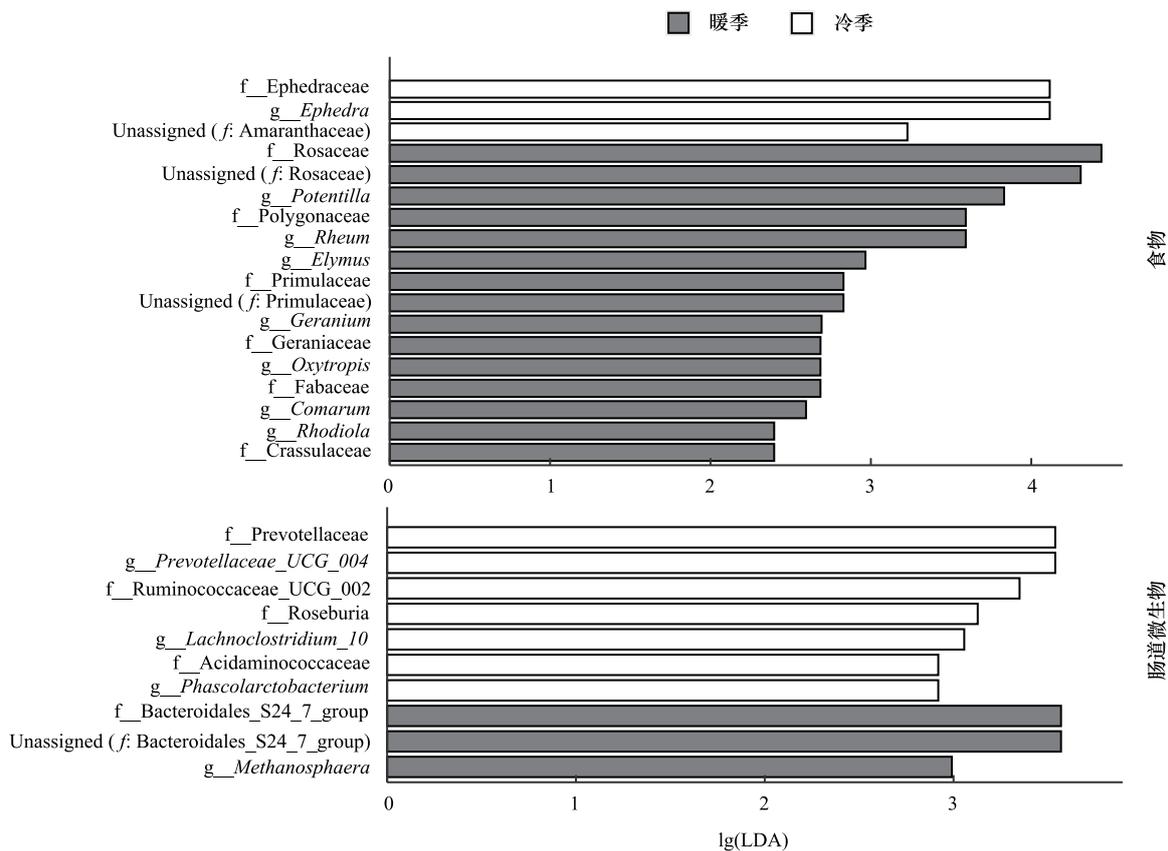


图 5 暖季与冷季帕米尔盘羊食物与肠道微生物序列丰度 LEfSe 分析

Fig.5 The LEfSe analysis of diet and gut microbial of Marco Polo sheep between warm and cold seasons

纵坐标为季节间具有显著差异的分类单元,横坐标为对应分类单元的线性判别分析 (Linear Discriminant Analysis, LDA) 对数得分值, $LDA > 2, P < 0.05$

2.4 食物与肠道微生物组成相关性分析

从科水平分析帕米尔盘羊食物相对丰度与肠道微生物相关性,发现无论冷暖季二者相对丰度之间的 Spearman 相关性均产生了两个食物-微生物簇 (图 6)。冷季和暖季的优势肠道微生物菌科 (相对丰度 $> 1\%$)

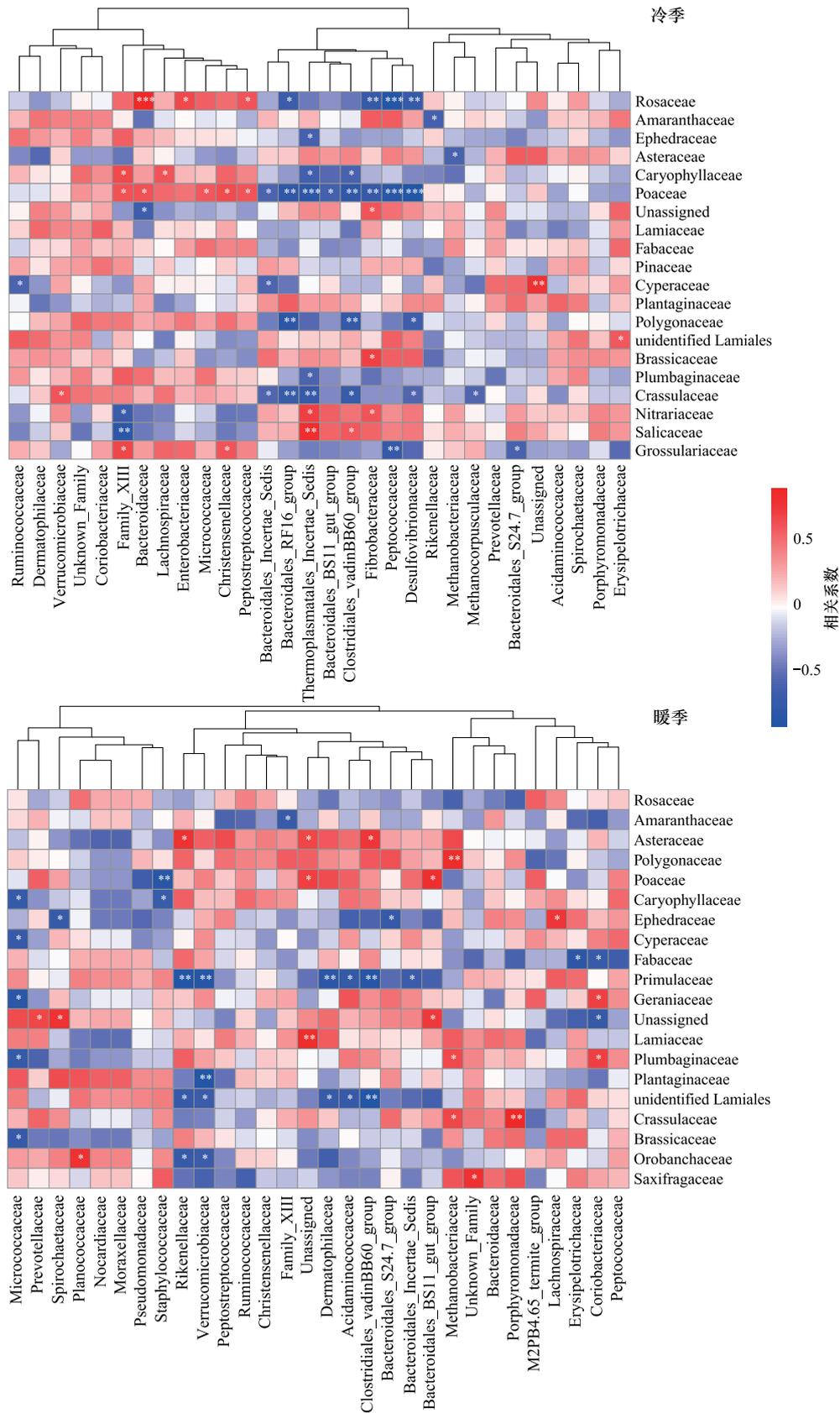


图 6 冷季和暖季科水平食物丰度与肠道微生物丰度相关性热图

Fig.6 Heatmap showing the association of family-level gut microbial abundance data with diet abundance data in cold and warm seasons 食物丰度前 20 物种,肠道微生物前 30 物种. 颜色范围从蓝色 (负相关) 到红色 (正相关); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

都与不同的食物表现出不同的正相关和负相关关系。在冷季,厚壁菌门的瘤胃球菌科与莎草科 (Cyperaceae) 呈负相关 ($P<0.05$);毛螺球菌科与石竹科呈正相关。拟杆菌门的理研菌科与苋科呈负相关;拟杆菌科 (Bacteroidaceae) 与蔷薇科呈极显著正相关 ($P<0.001$)、与禾本科呈正相关;Bacteroidales_S24-7_group 科与茶藨子科呈负相关。疣微菌门的疣微菌科 (Verrucomicrobiaceae) 与景天科呈正相关 (图 6)。在暖季,厚壁菌门的毛螺球菌科与麻黄科呈正相关。拟杆菌门的理研菌科与菊科呈正相关;Bacteroidales_S24-7_group 科与麻黄科呈负相关。疣微菌门的疣微菌科与报春花科、车前科呈显著负相关 ($P<0.01$)。广古菌门的产甲烷菌科与蓼科呈显著正相关 ($P<0.01$) (图 6)。这些结果证实了 LEfSe 分析的结果,季节差异显著的菌科与一些特定的食物显著相关,表明食性与肠道微生物的协同变化是帕米尔盘羊应对季节变化和环境影响的有利因素。

2.5 肠道微生物功能预测季节差异分析

利用 PICRUSt 软件功能预测肠道微生物代谢功能并进行季节差异分析,结果显示,在预测的肠道微生物三级功能代谢通路中,一些通路存在着显著季节性差异 (图 7)。冷季相对丰度显著大于暖季的功能通路有 12-、14- 和 16-元大环内酯类化合物的生物合成;蛋白质的消化和吸收与氨基酸代谢;与免疫相关的新霉素生物合成与异喹啉生物碱的生物合成通路等。暖季相对丰度显著大于冷季的功能通路有甘油酯代谢;碳水化合物的消化和吸收;维持血糖水平的胰岛素信号传导通路;维持水分平衡的血管加压素调节的水重吸收通路;处理有害物质的二甲苯降解与二恶英降解通路等。因此,这些结果表明在冷暖季帕米尔盘羊的一些肠道微生物功能存在差异,以应对季节变化和食性变化。

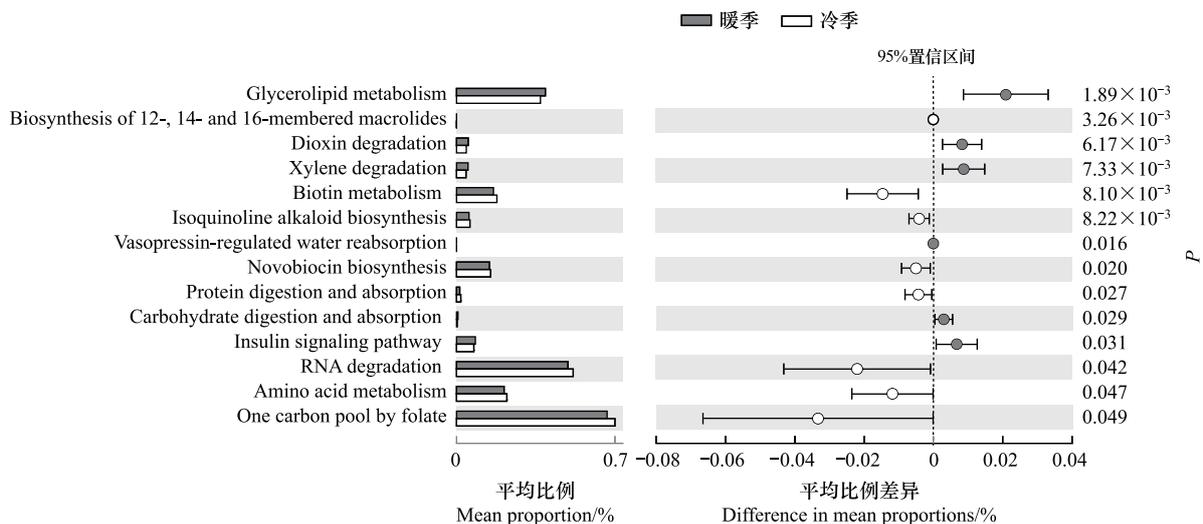


图 7 KEGG 预测的帕米尔盘羊肠道微生物三级功能代谢途径季节差异分析

Fig.7 Analysis of seasonal differences in metabolic pathway level 3 of gut microbial predicted by KEGG in Marco Polo sheep

3 讨论

肠道微生物群落是一个高度复杂且不断变化的生态系统^[6],对诸如饮食改变与环境变化等外部干扰极为敏感^[51]。食物是影响肠道微生物组成和功能差异的主要因素之一,食物组成变化会导致肠道微生物组成相应变化^[52]。在高海拔地区,野生有蹄类动物面临着严峻的挑战,尤其是在寒冷且食物资源匮乏的冷季。例如青藏高原放牧牦牛 (*Bos grunniens*) 在季节变化下,肠道微生物组成随着食性变化而变化^[11]。作为帕米尔高原的旗舰物种,帕米尔盘羊的食性与肠道微生物的季节变化研究对于理解其生态适应策略至关重要。

本研究结果表明,帕米尔盘羊的食物组成在季节间存在显著差异,尤其在冷季,其营养生态位呈现出扩张

的趋势。这一变化对于帕米尔盘羊适应极端环境条件起到了至关重要的作用。

3.1 食性季节性变化的生态适应意义

虽然 α 多样性结果表明帕米尔盘羊在冷暖季具有相似的食物丰富度与均匀度。但是 β 多样性结果显示冷季食物组成差异显著高于暖季,这可能与其食物资源可利用性的季节性变化紧密相关。这些差异可能与营养生态位宽度的变化有关,因为生态位宽度的变化反映了动物对不同季节食物资源的利用策略^[53]。具体而言,帕米尔盘羊在冷季的营养生态位宽度高于暖季。保护区冷季极端干旱寒冷、雪地覆盖且草场枯竭,植被覆盖度较低,主要以耐寒的草本植物和垫状植物为主,食物资源的稀缺性和可利用性的下降,迫使帕米尔盘羊拓宽其营养生态位以适应食物资源短缺来满足其能量和营养需求^[17]。而在暖季,随着温度升高和融雪增加,植被生长条件得到改善,蒿类半灌木、小丛禾草等草地资源植物生长更加茂盛^[54],使得帕米尔盘羊能够更专一地选择喜食植物,从而导致食性的特化^[55-56]。在冷季,高山植被常被冰雪覆盖,导致有蹄类动物迁移到海拔较低、植被较好的地区^[26],这也可能是帕米尔盘羊在冷季食物泛化的原因之一。同时由于食物资源短缺导致冷季种间和种内竞争强度增加,帕米尔盘羊通过拓宽生态位来减少与其他物种或种内其他个体的竞争,避免与其他物种的生态位重叠,从而与同域分布的有蹄类达到种间共存^[18]。上述采食策略导致了帕米尔盘羊食性的季节性变化,进而可能影响其肠道微生物组成和功能。

3.2 食性对肠道微生物组成的影响

食物对宿主肠道微生物的多样性具有显著影响^[57]。在本研究中,发现帕米尔盘羊的肠道微生物组成在食性季节性变化的作用下呈现出显著变化。相较于暖季,帕米尔盘羊冷季肠道微生物群落多样性显著增加。肠道微生物多样性越高,其组成越复杂、越稳定,从而具备更强的抵抗外界干扰、适应环境变化以及恢复自身平衡的能力^[58],这对于帕米尔盘羊在冷季应对极端环境至关重要。研究表明蔷薇科、苜科、菊科、麻黄科和禾本科等植物是帕米尔盘羊的主要食物,其中非禾草类草本植物在全年食物组成中的占比高达 82.98%。有研究表明帕米尔盘羊偏好于在非禾草类草本植物种数较高的生境中觅食^[26],本研究结果与前人的研究一致。高原地区非禾草类草本植物的粗蛋白含量较高^[59],这可能是帕米尔盘羊喜食该类植物的原因之一。特别是蔷薇科与菊科植物,其纤维与粗脂肪含量较高^[60-61],帕米尔盘羊大量采食这些植物可能与其消化系统和特殊的肠道微生物组成密切相关。本研究发现,某些食物种类与帕米尔盘羊特定肠道微生物类群之间存在显著的正相关或负相关关系。例如在冷季,肠道中拟杆菌科的相对丰度与宿主食物中蔷薇科的比例呈极显著正相关;而在暖季,宿主肠道中理研菌科相对丰度与菊科呈正相关。有研究证实理研菌科在菊科植物粗脂肪的代谢过程中发挥了重要作用^[62]。上述发现进一步支持了帕米尔盘羊食性与肠道微生物之间的密切联系,并证实帕米尔盘羊可能通过食物选择调整其肠道微生物组成,以适应不同季节的营养需求和环境胁迫。

3.3 肠道微生物的季节性变化及其适应作用

从菌群结构来看,厚壁菌门和拟杆菌门是帕米尔盘羊肠道的核心菌门,它们在有蹄类食草动物肠道中广泛存在^[63],在帕米尔盘羊消化食物过程中也发挥着关键作用。厚壁菌门可将纤维素分解为可利用挥发性脂肪酸,从而帮助帕米尔盘羊提高营养利用率^[64]。拟杆菌门是重要的多糖降解利用菌,能够降解非纤维物质,提高帕米尔盘羊对碳水化合物、蛋白质和其他物质的利用率,并增强其免疫性^[65-66]。此外,疣微杆菌门和广古菌门也在帕米尔盘羊肠道中显著富集。疣微杆菌门具有抗炎特性,有助于帕米尔盘羊肠道的葡萄糖稳态^[67]。这些核心菌门的稳定存在,反映了宿主与肠道微生物之间的互利关系,提高帕米尔盘羊对高海拔极端环境的适应能力^[11]。

冷季帕米尔盘羊肠道微生物中拟杆菌门丰度显著增加,这可能与冬季低温有关。冬季帕米尔盘羊需要获取更多能量抵御寒冷,拟杆菌门的普雷沃菌科丰度显著升高,能够更好的消化糖蛋白促进机体吸收利用,并改善葡萄糖的代谢促进机体糖原吸收^[68]。肠道微生物 KEGG 3 级的功能预测显示,冷季酯类化合物的生物合成途径显著增加,这有助于帕米尔盘羊囤积脂肪。同时蛋白质消化和吸收以及氨基酸代谢途径显著增加,这有助于帕米尔盘羊在蛋白质摄入不足的情况下更有效地利用氮和能量^[65-66]。另外,新霉素抗生素合成途径,

以及异喹啉生物碱的合成显著增加,能够提高帕米尔盘羊的免疫功能使之更适应冷季极端环境。

在暖季,帕米尔盘羊的肠道微生物中产甲烷菌科的丰度显著增加,该菌能促进碳水化合物发酵并产生短链脂肪酸^[69]。研究表明,短链脂肪酸的增加与脂肪生成的减少相关,有助于促进脂肪酸的氧化和抑制其合成,从而减少脂肪的储存^[70]。这与甘油酯代谢途径的增加一致,有助于帕米尔盘羊减少脂肪的积累。暖季食物资源充足,帕米尔盘羊可能无需存储大量脂肪作为能量储备,而是通过频繁进食满足能量需求。进而通过脂质代谢和碳水化合物的代谢产生能量来满足其在更长的日照时间内更高的活动水平,以及支持其繁殖季节的繁殖活动^[71]。胰岛素信号传导通路的增加有助于其维持能量平衡和血糖水平,而血管加压素调节的水重吸收通路使帕米尔盘羊避免更高的水分蒸发和脱水风险以维持水分平衡^[10]。综上,帕米尔盘羊的肠道微生物和代谢途径的调整反映了其对环境变化的适应性。

4 结论与展望

综上所述,本研究深入探讨了帕米尔盘羊在不同季节的食物与肠道微生物组成结构及两者的关系。结果表明帕米尔盘羊食性具有显著的季节变化,冷季其营养生态位出现扩张趋势,这表明帕米尔盘羊可能采取不同的采食策略以应对该季节食物资源的匮乏。此外,帕米尔盘羊肠道微生物组成也随食性的季节变化而相应调整,这一研究结论加深了对食物组成如何影响肠道微生物多样性的理解。本研究观察到在不同季节显著富集的肠道菌群,以及稳定存在的核心菌门,这反映了宿主与肠道微生物之间的互利关系,从而提高了帕米尔盘羊对高海拔极端环境的适应能力。此外,本研究对帕米尔盘羊肠道微生物功能预测显示,在冷季与酯类化合物的生物合成、蛋白质消化与吸收代谢相关的功能基因的相对丰度显著增加;而在暖季则与脂肪代谢和碳水化合物消化吸收代谢相关的功能基因的相对丰度显著增加。这一变化反映了帕米尔盘羊通过调节肠道微生物的功能来适应季节性环境变化,从而调节其体内的代谢水平。这些研究结果为未来进一步探索帕米尔盘羊在季节变化引起的环境变化过程中的适应机制奠定了基础,并为通过宏基因组学等手段进一步揭示相关机制提供了可能的方向。

致谢:塔什库尔干保护区管理服务中心对野外调查和采样给予帮助,特此致谢。

参考文献(References):

- [1] Amato K R, Leigh S R, Kent A, Mackie R I, Yeoman C J, Stumpf R M, Wilson B A, Nelson K E, White B A, Garber P A. The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (*Alouatta pigra*). *Microbial Ecology*, 2015, 69(2): 434-443.
- [2] Guisan A, Petitpierre B, Broennimann O, Daehler C, Kueffer C. Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(5): 260-269.
- [3] Maurice C F, Knowles S C L, Ladau J, Pollard K S, Fenton A, Pedersen A B, Turnbaugh P J. Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *The ISME Journal*, 2015, 9(11): 2423-2434.
- [4] Quigley E M M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 2010, 61(3): 213-218.
- [5] Sommer F, Ståhlman M, Ilkayeva O, Arnemo J M, Kindberg J, Josefsson J, Newgard C B, Fröbert O, Bäckhed F. The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Cell Reports*, 2016, 14(7): 1655-1661.
- [6] Johnson A J, Vangay P, Al-Ghalith G A, Hillmann B M, Ward T L, Shields-Cutler R R, Kim A D, Shmagel A K, Syed A N, Students P M C, Walter J, Menon R, Koecher K, Knights D. Daily sampling reveals personalized diet-microbiome associations in humans. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(6): 789-802.e5.
- [7] Wang L, Huang G P, Hou R, Qi D W, Wu Q, Nie Y G, Zuo Z Q, Ma R, Zhou W L, Ma Y J, Hu Y B, Yang Z S, Yan L, Wei F W. Multi-omics reveals the positive leverage of plant secondary metabolites on the gut microbiota in a non-model mammal. *Microbiome*, 2021, 9(1): 192.
- [8] Hicks A L, Lee K J, Couto-Rodriguez M, Patel J, Sinha R, Guo C, Olson S H, Seimon A, Seimon T A, Ondzie A U, Karesh W B, Reed P, Cameron K N, Lipkin W I, Williams B L. Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nature Communications*, 2018, 9: 1786.
- [9] Bergmann G T, Craine J M, Robeson M S 2nd, Fierer N. Seasonal shifts in diet and gut microbiota of the American *Bison* (*Bison bison*). *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142409.
- [10] Qin W, Huang Y G, Wang L, Lin G H, Yang J D, Song P F, Gao H M, Zhang J J, Zhang T Z. Gut Microbiota enabled Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa*) to Adapt to Seasonal Changes. *Pakistan Journal of Zoology*, 2020, 52(5): 1637-1646.

- [11] Guo N, Wu Q F, Shi F Y, Niu J H, Zhang T, Degen A A, Fang Q G, Ding L M, Shang Z H, Zhang Z G, Long R J. Seasonal dynamics of diet-gut microbiota interaction in adaptation of yaks to life at high altitude. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7: 38.
- [12] Fedosenko A K, Blank D A. *Ovis ammon*. *Mammalian Species*, 2005(773): 1-15.
- [13] Gao X Y, Xu W X, Yang W K, David A B, Qiao J F, Xu K F. Status and distribution of ungulates in Xinjiang, China. *Journal of Arid Land*, 2011, 3(1): 49-60.
- [14] 蒋志刚. 中国脊椎动物生存现状研究. *生物多样性*, 2016, 24(5): 495-499.
- [15] 国家林业和草原局. 国家重点保护野生动物名录. (2021-02-01) [2024-01-22]. <https://www.forestry.gov.cn/main/5461/20210205/122418860831352.html>.
- [16] 魏辅文. 中国兽类分类与分布. 北京: 科学出版社, 2022.
- [17] 王玉涛, 戴志刚, 杨世杰, 罗玉柱. 东帕米尔高原盘羊分布与栖息地植被覆盖时空变化. *生态学报*, 2016, 36(1): 209-217.
- [18] Schaller G B, Li H, Talipu, Lu H, Ren J R, Qiu M J, Wang H B. Status of large mammals in the Taxkorgan Reserve, Xinjiang, China. *Biological Conservation*, 1987, 42(1): 53-71.
- [19] 龚明昊, 戴志刚, 曾治高, 张琼, 宋延龄. 新疆塔什库尔干自然保护区马可波罗盘羊种群数量和栖息地初步调查. *兽类学报*, 2007, 27(4): 317-324.
- [20] Khan B, Ablimit A, Khan G, Jasra A W, Ali H, Ali R, Ahmad E, Ismail M. Abundance, distribution and conservation status of Siberian ibex, Marco Polo and Blue sheep in Karakoram-Pamir Mountain area. *Journal of King Saud University - Science*, 2016, 28(3): 216-225.
- [21] Valdez R, Michel S, Subbotin A, Klich D. Status and population structure of a hunted population of Marco Polo Argali *Ovis ammon polii* (Cetartiodactyla, Bovidae) in Southeastern Tajikistan. *Mammalia*, 2016, 80(1): 49-57.
- [22] 陈强强, 李美玲, 韩芳, 汪沐阳, 徐文轩, 杨维康. 新疆塔什库尔干野生动物自然保护区马可波罗盘羊种群调查. *四川动物*, 2018, 37(6): 637-645.
- [23] 余玉群, 郭松涛, 刘楚光, 姬明周, 吐逊江, 李维东. 我国马可波罗盘羊种群数量和年龄结构. *野生动物*, 2009, 30(6): 293-296.
- [24] 阿不力米提·阿布都卡迪尔, 戴志刚, 史军, 王政. 新疆塔什库尔干高山-高原区盘羊和北山羊冬季资源调查报告. *干旱区资源与环境*, 2010, 24(11): 174-179.
- [25] Wang M Y, Blank D, Wang Y T, Xu W X, Yang W K, Alves J. Seasonal changes in the sexual segregation patterns of Marco Polo sheep in Taxkorgan Nature Reserve. *Journal of Ethology*, 2019, 37(2): 203-211.
- [26] 张晓晨, 徐文轩, 汪沐阳, 杨维康. 马可波罗盘羊夏季采食地选择. *动物学杂志*, 2019, 54(5): 617-626.
- [27] 李美玲, 陈强强, 汪沐阳, 杨维康, 张弛, 罗格平, 丁建丽, 林昱辰. 基于 MaxEnt 模型的马可波罗盘羊生境适宜性评价. *生态学杂志*, 2019, 38(2): 594-603.
- [28] Zhuo Y Y, Wang M Y, Liu Z J, Xu W X, Abdunazar A, Rajabi A M, Davletbakov A, Haider J, Khan M Z, Loik N, Faryabi S P, Michel S, Ostrowski S, Moheb Z, Ruckstuhl K, da Silva A A, Alves J, Yang W K. Border fences reduce potential for transboundary migration of Marco Polo Sheep (*Ovis ammon polii*) in the Pamir Plateau. *The Science of the Total Environment*, 2024, 912: 169298.
- [29] 严丽君, 王普, 施启龙, 刘佳, 施云娥, 池利昆. 动物食性分析在生态学中的应用研究进展——基于 DNA 宏条形码技术. *生态学报*, 2023, 43(8): 3007-3019.
- [30] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [31] Monterroso P, Godinho R, Oliveira T, Ferreras P, Kelly M J, Morin D J, Waits L P, Alves P C, Mills L S. Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis. *Mammal Review*, 2019, 49(2): 97-112.
- [32] Kartzinel T R, Chen P A, Coverdale T C, Erickson D L, Kress W J, Kuzmina M L, Rubenstein D I, Wang W, Pringle R M. DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(26): 8019-8024.
- [33] Gebremedhin B, Flagstad Ø, Bekele A, Chala D, Bakkestuen V, Boessenkool S, Popp M, Gussarova G, Schröder-Nielsen A, Nemomissa S, Brochmann C, Stenseth N C, Epp L S. DNA metabarcoding reveals diet overlap between the endangered walia ibex and domestic goats - implications for conservation. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159133.
- [34] Erickson D L, Reed E, Ramachandran P, Bourg N A, McShea W J, Ottesen A. Reconstructing a herbivore's diet using a novel rbcL DNA mini-barcode for plants. *AoB Plants*, 2017, 9(3): plx015.
- [35] 梁果栋. 塔什库尔干野生动物保护区成立. *新疆林业*, 1984(5): 26.
- [36] 汪沐阳, 张楚婕, 宓春荣, 韩雷, 李美玲, 徐文轩, 杨维康. 气候变化对中国马可波罗盘羊适宜生境的潜在影响. *应用生态学报*, 2021, 32(9): 3127-3135.
- [37] Liu Z F, Ci X Q, Li L, Li H W, Conran J G, Li J. DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175788.
- [38] 官爽, 张萍, 栾雪, 包衡, 姜广顺. 粪便显微分析和 DNA 宏条形码技术在野猪食性分析中的应用和比较. *野生动物学报*, 2022, 43(3): 645-653.
- [39] 郑佳鑫, 左清秋, 王刚, 韦旭, 翁晓东, 王正寰. 藏狐的食物组成及其季节差异. *兽类学报*, 2023, 43(4): 398-411.
- [40] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [41] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, Gevers D, Gordon J I, Knight R, Mills D A, Caporaso J G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2013, 10: 57-59.

- [42] 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.
- [43] 陆琪, 胡强, 施小刚, 金森龙, 李晟, 姚蒙. 基于分子宏条形码分析四川卧龙国家级自然保护区雪豹的食性. *生物多样性*, 2019, 27(9): 960-969.
- [44] 邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯, 李晟, 姚蒙. 基于粪便 DNA 及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析. *生物多样性*, 2019, 27(5): 543-556.
- [45] 湛振杰, 张超, 陈敏豪, 王嘉栋, 富爱华, 范雨薇, 栾晓峰. 基于 DNA 宏条形码技术的大兴安岭北部欧亚水獭冬季食性分析. *生物多样性*, 2023, 31(6): 85-96.
- [46] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, McDonald D, Knights D, Reyes J A, Clemente J C, Burkpile D E, Vega Thurber R L, Knight R, Beiko R G, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 814-821.
- [47] Levins R. Evolution in changing environments: some theoretical explorations. 1968.
- [48] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett W S, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [49] Chen T, Liu Y X, Huang L Q. ImageGP: an easy-to-use data visualization web server for scientific researchers. *iMeta*, 2022, 1(1): e5.
- [50] Dong Z H, Zhang S, Cheng Y W, He X C, Haase I, Liang Y, Jiang Y, Wu Y J. Comparative analysis of the intestinal tract microbiota and feeding habits of five sympatric flycatchers. *Avian Research*, 2022, 13: 100050.
- [51] Ren T T, Boutin S, Humphries M M, Dantzer B, Gorrell J C, Coltman D W, McAdam A G, Wu M. Seasonal, spatial, and maternal effects on gut microbiome in wild red squirrels. *Microbiome*, 2017, 5(1): 163.
- [52] Claesson M J, Jeffery I B, Conde S, Power S E, O'Connor E M, Cusack S, Harris H M B, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald G F, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi J R, Fitzgerald A P, Shanahan F, Hill C, Ross R P, O'Toole P W. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 2012, 488: 178-184.
- [53] Colwell R K, Futuyma D J. On the measurement of niche breadth and overlap. *Ecology*, 1971, 52(4): 567-576.
- [54] 梁娜. 帕米尔高原植物区系及草地资源图编制的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [55] Westoby M. An analysis of diet selection by large generalist herbivores. *The American Naturalist*, 1974, 108(961): 290-304.
- [56] 李忠秋, 蒋志刚. 青海省天峻地区藏原羚的食性分析. *兽类学报*, 2007, 27(1): 64-67.
- [57] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P J, Ramey R R, Bircher J S, Schlegel M L, Tucker T A, Schrenzel M D, Knight R, Gordon J I. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, 320(5883): 1647-1651.
- [58] Lang J M, Pan C, Cantor R M, Tang W H W, Garcia-Garcia J C, Kurtz I, Hazen S L, Bergeron N, Krauss R M, Lusa A J. Impact of individual traits, saturated fat, and protein source on the gut microbiome. *mBio*, 2018, 9(6): e01604-e01618.
- [59] Long R J, Apori S O, Castro F B, Ørskov E R. Feed value of native forages of the Tibetan Plateau of China. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, 80(2): 101-113.
- [60] 黄晓霞, 韩京萨, 刘全儒, 江源, 和克俭. 小五台亚高山草甸植物地上生物量及其营养成分研究. *草业科学*, 2008, 25(11): 5-12.
- [61] 赵朋波. 贺兰山岩羊 (*Pseudois nayaur*) 主要活动区植物群落特征及岩羊可食植物养分含量研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
- [62] Zhou L Y, Xiao X H, Zhang Q, Zheng J, Li M, Yu M, Wang X J, Deng M Q, Zhai X, Li R R. Improved glucose and lipid metabolism in the early life of female offspring by maternal dietary genistein is associated with alterations in the gut microbiota. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 516.
- [63] Shi L P, Yang X F, Dou H S, Lyu T S, Wang L D, Zhou S Y, Shang Y Q, Dong Y H, Zhang H H. Comparative analysis of the gut microbiota of Mongolian gazelle (*Procapra gutturosa*) under fragmented habitats. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 830321.
- [64] Guan Y, Yang H T, Han S Y, Feng L M, Wang T M, Ge J P. Comparison of the gut microbiota composition between wild and captive Sika Deer (*Cervus nippon hortulorum*) from feces by high-throughput sequencing. *AMB Express*, 2017, 7(1): 212.
- [65] 马晨, 张和平, 刘彩虹, 赵洁. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展. *动物营养学报*, 2014, 26(4): 852-862.
- [66] Becker A A M J, Hesta M, Hollants J, Janssens G P J, Huys G. Phylogenetic analysis of faecal microbiota from captive cheetahs reveals underrepresentation of Bacteroidetes and Bifidobacteriaceae. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 43.
- [67] Lindenberg F, Krych L, Fielden J, Kot W, Frøkiær H, van Galen G, Nielsen D S, Hansen A K. Expression of immune regulatory genes correlate with the abundance of specific Clostridiales and Verrucomicrobia species in the equine ileum and cecum. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12674.
- [68] 朱宏斌, 沈伟, 王竞, 卢曙光, 赵岩, 乐率, 申梦宇, 李刚, 杨雨卉, 龚雅利, 李明, 谭银玲, 胡福泉. 宏基因组研究高脂饮食诱导小鼠的肥胖易感性与肠道菌群的关系. *第三军医大学学报*, 2017, 39(8): 773-780.
- [69] Chaudhary P P, Conway P L, Schlundt J. Methanogens in humans: potentially beneficial or harmful for health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(7): 3095-3104.
- [70] Maphosa Y, Jideani V A. Dietary fiber extraction for human nutrition—a review. *Food Reviews International*, 2016, 32(1): 98-115.
- [71] Song F C, Xu Y S, Peng P, Li H X, Zheng R X, Zhang H L, Han Y Y, Weng Q, Yuan Z R. Seasonal changes in the structure and function of gut microbiota in the muskrat (*Ondatra zibethicus*). *Metabolites*, 2023, 13(2): 248.

附表 1 帕米尔盘羊分别在科、属、种水平的食物组成及每种食物被取食频率

Appendix table 1 Diet composition and the consumed proportion of a given food of Marco Polo sheep at family, genus and species level					
科 Family	冷季	暖季	科 Family	冷季	暖季
属 Genus	Cold	Warm	属 Genus	Cold	Warm
种 Family	season/%	season/%	种 Family	season/%	season/%
蔷薇科 Rosaceae	32.29	64.56	白花枝子花 <i>Dracocephalum heterophyllum</i>	0.55	0.21
未鉴定蔷薇科	27.18	52.86	豆科 Fabaceae	1.03	1.25
委陵菜属 <i>Potentilla</i>	4.41	10.89	棘豆属 <i>Oxytropis</i>	1.00	1.16
蔷薇属 <i>Rosa</i>	0.48	0.51	黄芪属 <i>Astragalus</i>	0.00	0.05
毛莓草属 <i>Sibbaldianthe</i>	0.01	0.06	松科 Pinaceae	0.82	0.02
沼委陵菜属 <i>Comarum</i>	0.01	0.24	云杉属 <i>Picea</i>	0.82	0.02
西北沼委陵菜 <i>Comarum salesovianum</i>	0.00	0.12	雪岭杉 <i>Picea schrenkiana</i>	0.42	0.00
苋科 Amaranthaceae	20.71	8.01	莎草科 Cyperaceae	0.43	1.26
未鉴定苋科	2.52	0.21	薹草属 <i>Carex</i>	0.43	1.26
藜属 <i>Chenopodium</i>	17.93	7.76	尖苞薹草 <i>Carex microglochis</i>	0.21	0.60
藜 <i>Chenopodium album</i>	9.18	3.78	车前科 Plantaginaceae	0.32	0.24
驼绒藜属 <i>Krascheninnikovia</i>	0.14	0.04	车前属 <i>Plantago</i>	0.32	0.23
垫状驼绒藜 <i>Krascheninnikovia compacta</i>	0.07	0.02	平车前 <i>Plantago depressa</i>	0.16	0.11
球花藜属 <i>Blitum</i>	0.12	0.00	蓼科 Polygonaceae	0.24	4.93
球花藜 <i>Blitum virgatum</i>	0.06	0.00	篇蓄属 <i>Polygonum</i>	0.03	0.15
麻黄科 Ephedraceae	16.58	1.74	大黄属 <i>Rheum</i>	0.20	4.77
麻黄属 <i>Ephedra</i>	16.58	1.74	天山大黄 <i>Rheum wittrockii</i>	0.10	2.33
雌雄麻黄 <i>Ephedra fedtschenkoei</i>	8.48	0.85	十字花科 Brassicaceae	0.13	0.17
菊科 Asteraceae	14.56	7.46	白花丹科 Plumbaginaceae	0.11	0.27
未鉴定菊科	14.39	7.30	补血草属 <i>Limonium</i>	0.11	0.27
火绒草属 <i>Leontopodium</i>	0.09	0.05	景天科 Crassulaceae	0.09	0.21
蒿属 <i>Artemisia</i>	0.07	0.00	红景天属 <i>Rhodiola</i>	0.06	0.18
紫菀属 <i>Aster</i>	0.00	0.11	狭叶红景天 <i>Rhodiola kirilowii</i>	0.03	0.09
东俄洛紫菀 <i>Aster tongolensis</i>	0.00	0.05	报春花科 Primulaceae	0.03	0.62
石竹科 Caryophyllaceae	4.29	3.05	牻牛儿苗科 Geraniaceae	0.02	0.60
禾本科 Poaceae	3.43	4.11	老鹳草属 <i>Geranium</i>	0.02	0.60
未鉴定禾本科	2.42	2.28	草地老鹳草 <i>Geranium pratense</i>	0.00	0.29
针茅属 <i>Stipa</i>	0.36	0.15	未鉴定唇形目 unidentified Lamiales	0.19	0.21
披碱草属 <i>Elymus</i>	0.63	1.67	其他(科) Others	0.33	0.35
唇形科 Lamiaceae	1.08	0.44	未分类(科) Unassigned	3.32	0.50
青兰属 <i>Dracocephalum</i>	1.08	0.44			

附表 1 列出了帕米尔盘羊被取食频率大于 0.1% 的科及其中大于 0.05% 的属与种