



不同生态位对鸟类 肠道寄生虫组成的影响

宋茜¹, 侯志军¹, 王震^{1,2*}

(1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;
2. 国家林业和草原局野生动植物检测中心/东北林业大学司法鉴定所, 哈尔滨, 150040)

稿件运行过程

收稿日期: 2024-03-20

修回日期: 2024-04-17



关键词: 鸟类;

寄生虫;

肠道;

高通量测序;

18S rRNA

Keywords: Birds;

Parasites;

Intestine;

High-throughput sequenc-

ing;

18S rRNA

中图分类号: Q958.9

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2025)-02-0354-12

DOI: 10.12375/ysdwxb.20250213

摘要

影响鸟类肠道寄生虫种类的因素包括宿主、饮食习性和栖息地等,然而这些因素均由宿主特定的生态位决定。为研究不同生态位对鸟类肠道寄生虫种类的影响,通过18S rRNA高通量测序技术对东北地区石鸡(*Alectoris chukar*)、红尾斑鸠(*Turdus naumanni*)和金鸽(*Pluvialis fulva*)3种不同生态位的野生鸟类肠道寄生虫进行研究。研究样本共61只个体,包括25只石鸡、12只红尾斑鸠和24只金鸽,采集全部个体直肠内粪样用于高通量测序,同时剖检12只石鸡检查鸡异刺线虫(*Heterakis gallinarum*)。结果显示:61只鸟类个体寄生虫总检出率为60.66%,3种鸟类肠道寄生虫检出率相近;共检出21种寄生虫,其中原虫15种,蠕虫6种;3种鸟类肠道寄生虫种类差异显著,石鸡、红尾斑鸠和金鸽肠道寄生虫种类分别为6、11、5种,除石鸡和红尾斑鸠均检出同一种簇虫(*Gregarina caledia*)外,其他寄生虫种类均为每种鸟类独有。此外,在剖检的12只石鸡中,在7只个体盲肠内检出同一种蠕虫,经形态学和分子生物学鉴定,确定为鸡异刺线虫,并利用特异性引物检出鸡四毛滴虫(*Tetratrichomonas gallinarum*),剖检和鉴定结果与18S rRNA高通量测序结果相符。研究结果表明,3种野生鸟类肠道寄生虫感染情况较普遍。本研究填补了这3种鸟类肠道感染寄生虫的数据,可为研究不同生态位鸟类肠道寄生虫的感染情况提供借鉴。

基金项目: 国家林业和草原局重点野生动物保护技术支持项目(HFW220200050)

第一作者简介: 宋茜(1997—),女,硕士研究生;主要从事动物肠道微生物和寄生虫研究。E-mail:405508025@qq.com

*通信作者: 王震, E-mail:25252170@qq.com

Effects of Different Ecological Niches on the Composition of Avian Intestinal Parasites

SONG Qian¹, HOU Zhijun¹, WANG Zhen^{1,2*}

(1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;

2. National Forestry and Grassland Administration Wildlife Detection Center / Northeast Forestry University Judicial Identification Institute, Harbin, 150040, China)

Abstract: Factors influencing the diversity of intestinal parasites of birds include the host, dietary habits, and habitat, all of which are determined by the host's specific ecological niche. To investigate the effects of different niches on the diversity of intestinal parasites of birds, this study employed 18S rRNA high-throughput sequencing to examine the intestinal parasites of three wild birds species occupying distinct ecological niches in northeastern China: chukar partridge (*Alectoris chukar*), Naumann's thrush (*Turdus naumanni*), and Pacific golden plover (*Pluvialis fulva*). A total of 61 individual birds were sampled, including 25 chukar partridges, 12 Naumann's thrushes, and 24 Pacific golden plovers. Fecal samples were collected from the rectum of each individual for high-throughput sequencing, and 12 chukar partridges were dissected to inspect for *Heterakis gallinarum*. Results showed an overall parasite detection rate 60.66% across all 61 birds, with similar detection rates among the three species. A total of 21 parasite species were identified, including 15 protozoa and six worms. Significant differences were observed in the parasite species among the three bird species with six, 11, and five parasite species detected in chukar partridges, Naumann's thrushes, and Pacific golden plovers, respectively. Aside from the detection of *Gregarina caledia* in both chukar partridges and Naumann's thrushes, all other parasite species were unique to each bird species. Additionally, *Heterakis gallinarum* was detected in the cecum of seven out of the 12 dissected chukar partridges confirmed through morphological and molecular identification, and *Tetratrichomonas gallinarum* was detected using specific primers. The dissection and identification results were consistent with the 18S rRNA high-throughput sequencing data. The findings reveal a widespread infection of intestinal parasites in the three wild birds species. This study filled a data gap on intestinal parasite infections in these bird species and provides a reference for future research on the infection patterns of intestinal parasite in birds from different ecological niches.

鸟类宿主的生态习性,如其栖息地、饮食习性和迁徙行为等,不仅决定了鸟类可接触到的寄生虫种类,也影响寄生虫的生命周期、传播方式和感染率^[1]。有研究表明,在同一栖息地中,宿主间的肠道寄生虫组成、种类和丰度具有高度相似性^[2]。不同栖息地提供了不同的生活资源和条件,这直接影响了鸟类可能接触到的寄生虫种类。例如,与非潜水鸟相比,潜水鸟体外寄生虫的多样性较低,这可能是大多数寄生虫无法承受水的浸泡^[3]。Rząd *et al.*^[4]发现,栖息在森林中的欧乌鸫(*Turdus merula*)比栖息在城市环境中的欧乌鸫拥有更丰富的寄生虫群落。鸟类的饮食选择可以直接影响其摄入的寄生虫种类和数量,对寄生虫群落起着关键作用^[5-7]。例如,

Violante-González *et al.*^[8]提出大白鹭(*Ardea alba*)和黄冠夜鹭(*Nyctanassa violacea*)的寄生虫群落差异归因于它们不同的饮食习惯;McLaughlin *et al.*^[9]发现迁徙鸭类肌胃内寄生线虫的流行程度和丰度与它们的饮食习惯有关。以人类食物源为主的环嘴鸥(*Larus delawarensis*)的胃肠道寄生虫多样性较低,这可能是它们摄入的作为寄生虫传播的中间宿主的数量较少^[10]。迁徙鸟类跨越不同地理区域,可能会接触到各种各样的寄生虫,同时也有可能将寄生虫从一个地区传播到另一个地区。之前的研究表明,迁徙鸟类比非迁徙鸟类拥有更多样化的寄生虫群落,与留鸟相比,迁徙鸟类具有相对较大的免疫防御器官,这可能是它们接触的寄生虫更多^[11]。寄生虫具

有多种多样的传播途径:一些生命周期简单的物种能够直接通过宿主摄入其卵来完成感染;而一些生命周期复杂的物种则通过多种无脊椎动物或脊椎动物作为中间宿主来完成传播^[12]。寄生虫的生命周期、传播方式和生存策略与宿主的生活方式密切相关^[12],因此,宿主寄生虫群落的分类组成也可反映宿主的饮食和生态。长期的共同进化使得某些寄生虫与特定鸟类宿主之间形成了紧密的寄生关系^[13]。宿主的生态位特征可能促进了寄生虫适应性的进化,使其能够有效完成其生命周期。以往的研究常常将影响鸟类肠道寄生虫组成的因素分开讨论。实际上,在野外环境中,宿主、栖息地和饮食习性等因素并不是孤立的,而是一个有机整体。本研究引入生态位理论,初步探索不同生态位对鸟类肠道寄生虫的影响,并提出假设:生态位是影响生态系统中鸟类肠道寄生虫组成的主要因素;当生态位重叠或相似时,宿主间将具有相似的寄生虫组成,当生态位不同时,鸟类宿主的肠道寄生虫差异显著。为验证上述假设,同时避免生态位重叠带来的影响,选择3种不同生态位的鸟类,研究其肠道寄生虫组成的异同。同时,鸟类肠道感染寄生虫可引起胃肠道损伤,对鸟类的消化、吸收、代谢和免疫力会产生不利影响^[14-15],严重影响鸟类的健康,因此,监测鸟类寄生虫对鸟类寄生虫的防治也具有重要意义。

本研究选取我国东北地区3种不同生态位的鸟类,即石鸡(*Alectoris chukar*)、红尾斑鸠(*Turdus naumanni*)和金鸽(*Pluvialis fulva*),调查其肠道寄生虫情况,并比较异同。在东北地区,石鸡为留鸟,属于陆禽;红尾斑鸠为夏候鸟,属于鸣禽;金鸽为夏候鸟,属于涉禽。由于该地区位于东亚-澳大利亚迁徙路线上^[16],因此,本研究对探索该路线上其他习性相近的迁徙鸟类感染寄生虫的情况也有借鉴意义。石鸡、红尾斑鸠和金鸽3种鸟类分属不同的生态类型,在生态系统中占据着不同的生态位。石鸡主要栖息于低山丘陵地带,以多样的植物性食物为主^[17];红尾斑鸠和金鸽分别在森林和湿地环境中栖息,以昆虫为主食^[18-19]。研究这3种鸟类肠道寄生虫情况,可以进一步理解鸟类宿主所处生态位和对寄生虫组成的影响,对于揭示寄生虫-宿主协同进化关系具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 样本来源

本研究使用的样本均来自执法机关侦办非法猎捕、非法买卖野生鸟类案件所查获的鸟类死体,包括石鸡样本25只,来源于辽宁西部;红尾斑鸠样本12只,来源于吉林省白山市;金鸽样本24只,来源于黑龙江省依安县。使用无菌拭子采集全部个体直肠内粪样,于冰箱中-80℃储存用于后续高通量测序。

寄生虫样本经剖检12只石鸡收集得到,将其编号后放至70%乙醇中固定保存。

1.2 18S rRNA高通量测序

1.2.1 粪便总DNA提取

使用QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit(50)试剂盒(QIAGEN, GER)提取粪便总DNA,将提取的DNA进行1%琼脂糖凝胶电泳,并用NanoDrop 2000(ThermoFisher, USA)对DNA的浓度和纯度进行测定。DNA于-20℃保存备用。

1.2.2 粪便18S rRNA基因扩增

通用引物TAReuk454FWD1[5'-CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3']和TAReukREV3[5'-AC TTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A-3']用于扩增粪便样本中真核生物18S rRNA基因V4区域^[20]。PCR采用TransGen AP221-02: TransStart FastPfu DNA Polymerase(北京全式金生物技术股份有限公司),20.0 μL反应体系:4.0 μL 5×FastPfu buffer,2.0 μL 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL上游引物(5 μmol/L),0.8 μL下游引物(5 μmol/L),0.4 μL FastPfu Polymerase,0.2 μL BSA,10.0 ng Template DNA,最后用ddH₂O补至20.0 μL。PCR仪为ABI GeneAmp[®] 9700型(Applied Biosystems, USA)。PCR反应参数:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃终延伸10 min。扩增产物使用2%琼脂糖凝胶电泳检测。使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN)切胶回收PCR产物,Tris_HCl洗脱。

1.2.3 文库构建和上机测序

参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor[™]-ST蓝色荧光定量系统(Promega)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求进行相应比例的混合。使用TruSeq[™] DNA Sample Prep Kit试剂盒

(Illumina, USA) 构建文库, 并通过 Illumina Miseq PE300 平台进行高通量测序。

1.2.4 测序数据处理及分析

原始下机数据通过标准 QIIME2 流程处理, 使用 fastp 软件 (v 0.19.6) 进行质控, 并使用 FLASH 软件 (v 1.2.7) 进行拼接。然后使用 DADA2 插件 (divisive amplicon denoising algorithm 2) 对质控拼接后的优化序列数据进行降噪处理, 处理之后的序列数据通常被称为扩增子序列变体 (amplicon sequence variants, ASV)。采用 BLAST best hit 物种注释法基于 silva138/18s_eukaryota 数据库 (<https://www.arb-silva.de>) 以 95% 序列一致性对 ASV 进行物种分类学注释。

从获得的 ASV 中, 筛选出所有与寄生虫相关的 ASVs, 并统计每种寄生虫的检出率。使用 Microsoft Excel 2020 创建数据表, 并通过 R 语言 (v 4.3.0) 进行 χ^2 检验, 以分析不同寄生虫的检出率是否存在显著差异, 其中显著性水平设置为 0.05。

1.3 剖检检查与鉴定

经高通量测序发现, 12 只石鸡样本中鸡异刺线虫 (*Heterakis gallinarum*) 的检出率最高, 同时鸡异刺线虫还是组织滴虫 (*Histomonas meleagridis*) 的宿主, 两者混合感染将对鸟类造成严重损伤, 然而目前并没有关于石鸡源鸡异刺线虫的分类研究, 因此研究团队对其进行了形态学和分子生物学研究, 以期为该寄生虫的分类提供参考依据。

虫体按照蠕虫学完全剖检法收集得到, 使用生理盐水逐一洗净后, 置于戊二醛 (体积分数 2.5%) 固定液中保存。形态学鉴定参照卢俊杰等^[21]的方法进行。虫体标本经乳酸酚溶液透明 2 h 后, 置于载玻片上, 在显微镜下观察其形态结构。分子生物学鉴定方法如下。

1.3.1 虫体 DNA 提取

从 70% 乙醇中随机取出 2 条虫体, 用双蒸水反复冲洗 2 次后, 将虫体放入灭菌研钵中, 加入少量 ddH₂O 充分研磨, 打碎处理为细胞悬液, 加入 200 μ L GA Buffer, 充分振荡混匀后再加入 20 μ L 蛋白酶 K, 混匀后放入恒温培养箱 56 $^{\circ}$ C 过夜, 使虫体充分裂解。然后使用 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (50) 试剂盒 (QIAGEN, GER) 提取目的虫体 DNA。将提取好的 DNA 样本置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 寄生虫 PCR 扩增

鸡异刺线虫通常和组织滴虫混合感染, 因此使用鸡异刺线虫引物 *coxI*-F (5'-CGTCTTGAGT TGGCTAAGC-3') 和 *coxI*-R (5'-CAATAACCATCGTA GCAGCC-3') 以及组织滴虫引物 18S rDNA-F (5'-AC TGTGAACAAATCAGGACG-3') 和 18S rDNA-R (5'-CTGGTTCTGGTAAGTTTCCC-3') 分别对已提取虫体的 DNA 和粪便 DNA 进行扩增^[22]。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。反应体系均为 50.0 μ L: ddH₂O 2.0 μ L, KOD One[™] PCR Master Mix 25.0 μ L, 上、下游引物各 1.5 μ L, DNA 模板 20.0 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 68 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。反应完成后, 吸取 5.0 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 结果显示 *coxI* 基因和 18S rRNA 基因扩增结果均为阳性。将阳性 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.3.3 序列分析和系统进化树构建

测序结果用 DNA Star 软件中的 EditSeq 去除引物序列, 获得完整的扩增序列, 并在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 下载相似基因序列, 使用 MEGA 11 软件中 NJ 法以伪旋毛虫 (*Trichinella spiralis*, GenBank 登录号 KU321696.1) 和绵羊夏伯特线虫 (*Charbertia ovina*, GenBank 登录号 KF913471.1) 为外群分别构建鸡异刺线虫和鸡四毛滴虫 (*Tetratrichomonas gallinarum*) 系统进化树, 各分支的置信度经 Bootstrap 法检验, 共 1 000 次循环。

2 结果

2.1 基于 18S rRNA 高通量测序分析

2.1.1 测序数据分析

测序数据经质量控制和降噪后, 61 只样本共得到 9 719 981 条有效序列, 平均序列长度为 383 bp。为了减少测序深度对后续分析结果的影响, 对每个样本降噪后的序列数据按最小序列数 (61 462 reads) 抽平, 最终共得到 832 个 ASV。其中, 与寄生虫相关的 ASV 有 56 个, 分属 5 门 7 纲 8 目 13 科 16 属。

2.1.2 寄生虫总体检出情况

本研究共检测 61 只鸟类个体粪便, 其中 37 份呈阳性, 总体寄生虫检出率约为 60.66%。共检出寄生虫 21 种, 其中原虫 15 种, 蠕虫 6 种 (表 1)。所有样本

中鸡异刺线虫检出率最高,为24.59%(15/61);其次是鹤艾美耳球虫(*Eimeria gruis*),检出率为14.75%(9/61);瑞氏艾美耳球虫(*E. reichenowi*)和鸟毛滴虫

(*Trichomonas gallinae*)的检出率分别为11.48%(7/61)和9.84%(6/61)。不同虫种检出率差异具有统计学意义($\chi^2 = 82.646, P < 0.05$)。

表1 三种鸟类高通量测序技术检出寄生虫结果

Table 1 Results of parasite detection in the three bird species using high-throughput sequencing

寄生虫 Parasite	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	阳性检出率/% Positive rate				
原虫 Protozoa	副基体门 Parabasalia	鞭毛虫总纲 Mastigophora	毛滴虫目 Trichomonadida	毛滴虫科 Trichomonadidae	四毛滴虫属 <i>Tetratrichomonas</i>	鸡四毛滴虫 <i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	4.92				
					毛滴虫属 <i>Trichomonas</i>	鸟毛滴虫 <i>Trichomonas gallinae</i>	9.84				
					螺壳鞭毛虫属 <i>Cochlosoma</i>	螺壳鞭毛虫 <i>Cochlosoma anatis</i>	1.64				
	顶复门 Apicomplexa	类锥体纲 Conoidasida	真球虫目 Eucoccidiorida	艾美耳科 Eimeriidae	艾美耳属 <i>Eimeria</i>	鹤艾美耳球虫 <i>Eimeria gruis</i>	14.75				
						瑞氏艾美耳球虫 <i>Eimeria reichenowi</i>	11.48				
						等孢球虫属 <i>Isospora</i>	诺氏等孢球虫 <i>Isospora robini</i>	1.64			
						簇虫科 Adeleidae	<i>Adelina</i>	<i>Adelina dimidiata</i>	3.28		
	纤毛门 Ciliophora	旋毛纲 Spirotrichea	尾柱虫目 Urostylida	全列虫科 Holostichidae	新尾柱虫属 <i>Neurostylopsis</i>	新尾柱虫 <i>Neurostylopsis</i> sp.	1.64				
						真簇虫目 Eugregarinorida	簇虫科 Gregarinidae	簇虫属 <i>Gregarina</i>	<i>Gregarina cuneata</i>	4.92	
									<i>Gregarina caledia</i>	8.20	
<i>Gregarina chortiocetes</i>									3.28		
Stylocephalidae						<i>Stylocephalus</i>	<i>Stylocephalus giganteus</i>	1.64			
							<i>Stylocephalus gigas</i>	1.64			
肾形目 Colodida	肾形纲 Colpodea	肾形虫科 Colpodidae	肾形虫属 <i>Colpoda</i>	肾形虫 <i>Colpoda</i> sp.	1.64						
				线虫动物门 Nematoda	线虫纲 Chromadorea	小杆目 Rhabditida	双三齿线虫科 Diplotrienidae	双三齿线虫属 <i>Diplotrienia</i>	双三齿线虫 <i>Diplotrienia anthreptis</i>	8.20	
蠕虫 Worms				滑刃科 Aphelenchoididae	滑刃线虫属 <i>Aphelenchoides</i>	滑刃线虫 <i>Aphelenchoides</i> sp.	1.64				
						异刺科 Heterakidae	异刺属 <i>Heterakis</i>	鸡异刺线虫 <i>Heterakis gallinarum</i>	24.59		
								刺嘴纲 Enoplea	毛形线虫目 Trichinellida	毛细科 Capillariidae	毛细线虫属 <i>Capillaria</i>
						毛形科 Trichinellidae	旋毛虫属 <i>Trichinella</i>				
								棘头动物门 Acanthocephala	古棘头虫纲 Palaeacanthocephala	多型目 Polymorphida	Plagiorhynchidae

在 37 份阳性样品中,检出 1 种寄生虫的占 45.95%(17/37);同时检出 2 种的占 32.43%(12/37);同时检出 3 种的占 13.51%(5/37);同时检出 4 种的占 8.11%(3/37)。混合阳性检出比例占 54.05%(20/37)。由此可见,鸟类肠道同时检出多种寄生虫的情况比较普遍。

2.1.3 3 种鸟类肠道寄生虫检出情况比较

每种鸟类肠道寄生虫的检出结果显示:金鸽的

寄生虫检出率最高,为 62.50%(15/24),优势虫种为鹤艾美耳球虫和瑞氏艾美耳球虫;其次为石鸡,检出率为 60.00%(15/25),优势虫种为鸡异刺线虫;红尾斑鸠粪便寄生虫检出率为 58.33%(7/12),优势虫种为双三齿线虫 (*Diplotrriaena anthreptis*) 和 *Gregarina cuneata*(表 2)。3 种鸟类粪便寄生虫检出率没有显著差异($\chi^2 = 0.066, P > 0.05$)。由此可见,鸟类肠道存在寄生虫的情况比较普遍。

表 2 三种鸟类肠道寄生虫检出种类及检出率

Table 2 Comparison of species and detection rates of intestinal parasites in three bird species

寄生虫 Parasite	检出率/% Detection rate		
	石鸡 <i>Alectoris chukar</i>	红尾斑鸠 <i>Turdus naumanni</i>	金鸽 <i>Pluvialis fulva</i>
鸡四毛滴虫 <i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	12.00	—	—
<i>Stylocephalus giganteus</i>	4.00	—	—
<i>Stylocephalus gigas</i>	4.00	—	—
滑刃线虫 <i>Aphelenchoides</i> sp.	4.00	—	—
鸡异刺线虫 <i>Heterakis gallinarum</i>	60.00	—	—
诺氏等孢球虫 <i>Isospora robini</i>	—	8.33	—
<i>Adelina dimidiata</i>	—	16.67	—
<i>Adelina grylli</i>	—	8.33	—
<i>Gregarina cuneata</i>	—	25.00	—
<i>Gregarina chortiocetes</i>	—	16.67	—
肾形虫 <i>Colpoda</i> sp.	—	8.33	—
双三齿线虫 <i>Diplotrriaena anthreptis</i>	—	41.67	—
鸭毛细线虫 <i>Capillaria anatis</i>	—	8.33	—
伪旋毛虫 <i>Trichinella pseudospiralis</i>	—	8.33	—
斜吻棘头虫 <i>Plagiorhynchus cylindraceus</i>	—	8.33	—
<i>Gregarina caledia</i>	16.00	8.33	—
鸟毛滴虫 <i>Trichomonas gallinae</i>	—	—	25.00
螺壳鞭毛虫 <i>Cochlosoma anatis</i>	—	—	4.17
鹤艾美耳球虫 <i>Eimeria gruis</i>	—	—	37.50
瑞氏艾美耳球虫 <i>Eimeria reichenowi</i>	—	—	29.17
新尾柱虫 <i>Neurostylopsis</i> sp.	—	—	4.17

2.1.4 三种鸟类肠道寄生虫组成差异

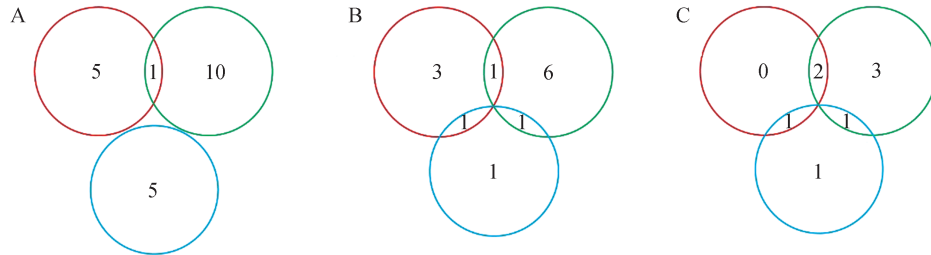
从寄生虫种水平及类型上看,石鸡检出蠕虫 2 种、原虫 4 种;红尾斑鸠检出蠕虫 4 种、原虫 7 种;金鸽检出原虫 5 种,3 种鸟类的寄生虫种类差异显著,其中仅石鸡和红尾斑鸠检出同一种寄生虫,即簇虫(图 1A),其他寄生虫仅在各自宿主中检出,未见跨物种共存。

从科水平看,红尾斑鸠肠道寄生虫涉及 8 科,其中簇虫科(*Gregarinidae*)种类数最多,为 3 种;石鸡肠道寄生虫共 5 科,其中 *Stylocephalidae* 种类最多,为 2 种;金鸽肠道寄生虫仅 3 科。在 3 个种间,每两种间仅检出一科同科寄生虫,如红尾斑鸠和石鸡间为簇虫科,红尾斑鸠和金鸽为艾美耳科(*Eimeriidae*),石鸡和金

鸽间为毛滴虫科(Trichomonadidae),但3种鸟类宿主间无共享科(图1B)。

从目水平上看,红尾斑鸠肠道寄生虫共6目,石鸡和金鸽均为3目。其中红尾斑鸠和石鸡共享2目,

分别是小杆目(Rhabditida)和真簇虫目(Eugregariorida);红尾斑鸠与金鸽共享真球虫目(Eucoccidiorida),石鸡与金鸽共享毛滴虫目(Trichomonadida),3种鸟类间无共享目(图1C)。



A. 种水平;B. 科水平;C. 目水平。图中红色、绿色、蓝色分别表示石鸡、红尾斑鸠和金鸽体内检出的寄生虫。

A. The level of species; B. The level of family; C. The level of order. In the figure, the red, green, and blue colors respectively represent the parasites detected in *Alectoris chukar*, *Turdus naumanni* and *Pluvialis fulva*.

图1 三种鸟类肠道寄生虫组成差异

Figure 1 The composition differences of three species of avian intestinal parasites

3种鸟类宿主间均没有共享同一分类阶元的寄生虫(种/科/目),表明3种间可能不存在影响寄生虫传播的共同因素。但在科水平上,每两种间的寄生虫均存在共同科,表明两种间可能存在影响寄生虫传播的共同因素。但总体上看,红尾斑鸠与石鸡之间影响寄生虫传播的共同因素可能更多。由此说明,影响3种鸟类肠道寄生虫传播的相似因素较少,即生态位重叠较少。

2.2 寄生虫剖检检查与鉴定

2.2.1 剖检法检出蠕虫情况

从剖检的12只石鸡个体中检出7只个体盲肠中存在寄生虫(图2(a)),检出率为58.33%。7只石鸡个体共检出寄生虫50条,其中一只个体检出寄生虫20条,数量最多,一只个体检出寄生虫1条,数量最少。

2.2.2 虫体形态学检查

经过解剖镜和生物显微镜观察(图2(b)-(d)),剖检所获寄生虫形态特征基本一致,确定为同一种寄生虫。虫体参数:雌虫体长7.60~11.58 mm,雄虫体长6.54~7.58 mm;雄虫交合刺长83.10~316.22 μm ,雌虫阴门到尾端距离为3.69~5.54 mm。

虫体形态呈圆柱形,中间粗两端细,整体呈乳白色。虫体头端均有3片不明显的唇片,1片为背唇,2片为亚腹唇。口腔短,食管前部为圆柱状,末端膨大为球状,具食管瓣;神经环位于食管前约1/3处,排泄孔位于食管中部。雄虫尾端有两根不等长的交合刺;雌虫的生殖孔在虫体的中前部,其尾端尖细且光

滑。以上特征与鸡异刺线虫基本特征相符。

2.2.3 分子生物学鉴定

从剖检获得的虫体中随机抽取2个样本,利用*cox1*特异性引物扩增测序(编号S1和S2)。测序获得基因序列总长约为805 bp,C+G含量为33.92%~35.16%。测序结果在NCBI上进行BLAST比对,结果显示:S1与四川自贡、广元鸡异刺线虫(GenBank登录号分别为KP308344.1,KP308363.1)的相似性最高,为98.50%;S2与四川自贡鸡异刺线虫(GenBank登录号分别为KP308362.1,KP308361.1)的相似性最高,为98.99%。基于*cox1*基因的系统进化树分析,本研究获得的虫体与四川自贡、广元鸡异刺线虫的遗传距离较近(图3),并与18S rRNA高通量测序检出的结果相符,由此可以判定,剖检获得的虫体为鸡异刺线虫。

同时,又利用特异性引物扩增测序获得了滴虫18S rRNA基因序列,总长约为439 bp,C+G含量约为47.38%,BLAST分析结果显示,在石鸡中获得的滴虫基因序列与越南鸡四毛滴虫(GenBank登录号为LK031721.1)的相似性最高,为98.17%。基于18S rRNA基因的系统进化树显示,本研究扩增的滴虫与越南鸡四毛滴虫(GenBank登录号为LK031721.1)、菲律宾鸡四毛滴虫(GenBank登录号为JX565082.1)和捷克鸡四毛滴虫(AY245110.1)的遗传距离较近,但均不在同一分支上(图4)。由此可以判定,该滴虫为鸡四毛滴虫,与18S rRNA高通量测序检出的结果相符。

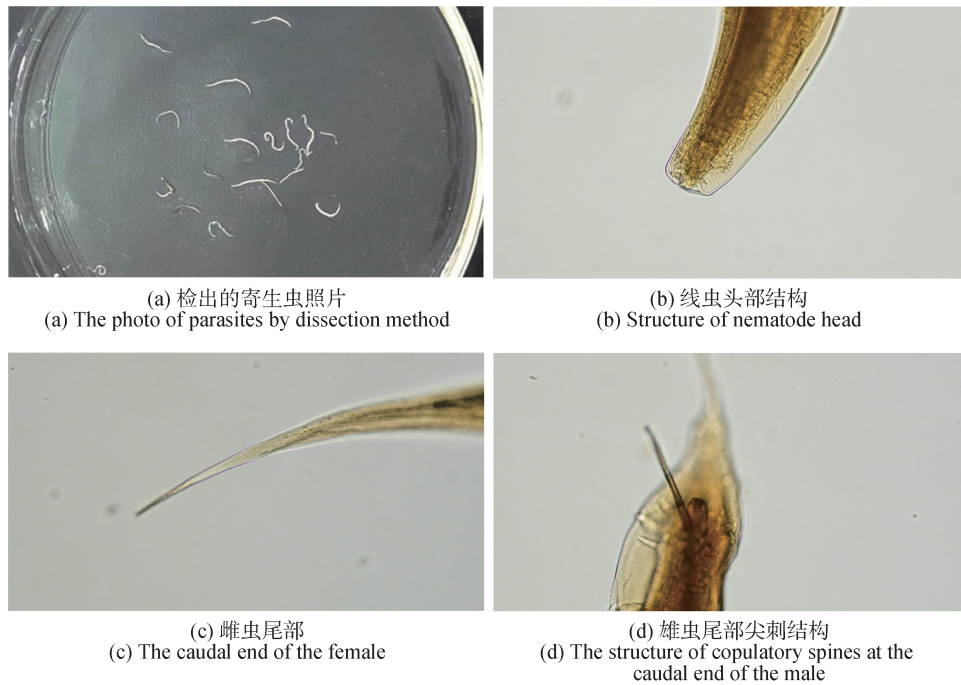


图2 从石鸡中检出的虫体照片及形态结构(×40)

Figure 2 Morphological structure and photo of the parasites from *Aleoctoris chukar* (×40)

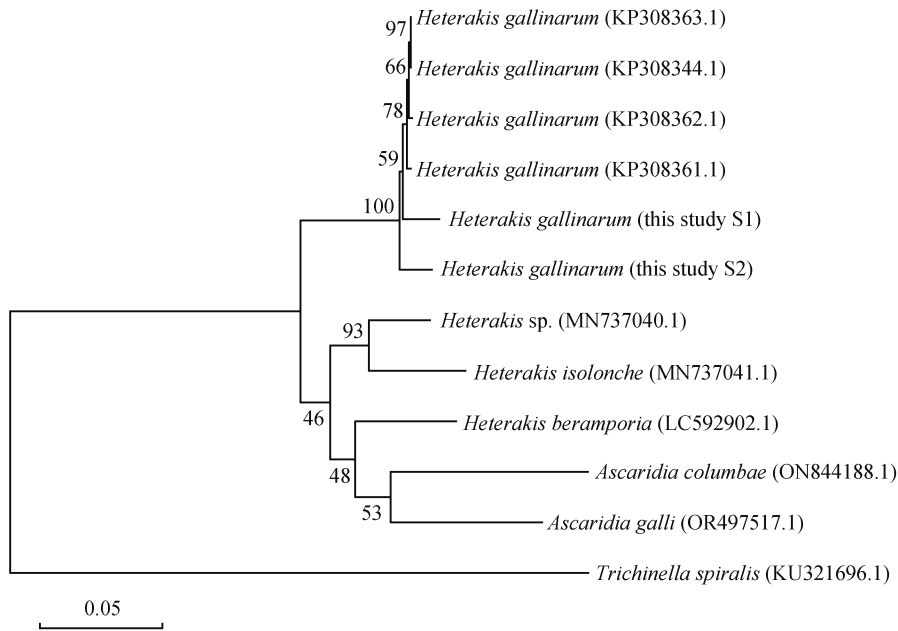


图3 邻接法构建的基于鸡异刺线虫 *cox1* 基因序列的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on the *cox1* gene sequences of *Heterakis gallinarum*

2.3 高通量测序结果与剖检结果比较

石鸡的剖检结果显示,在石鸡肠道内仅检出1种蠕虫,为鸡异刺线虫,检出率为58.33%(7/12);而高通量测序结果显示,石鸡肠道内检出2种蠕虫,一种为鸡异刺线虫,检出率为60.00%(15/25),一种为

滑刃线虫(*Aphelenchoides* sp.),检出率为4.00%(1/25)。两种方法关于异刺线虫的检出率接近。同时,石鸡剖检法特异性引物扩增检出了鸡四毛滴虫,也与高通量测序结果相符。由此说明,高通量测序结果注释具有一定的准确性。

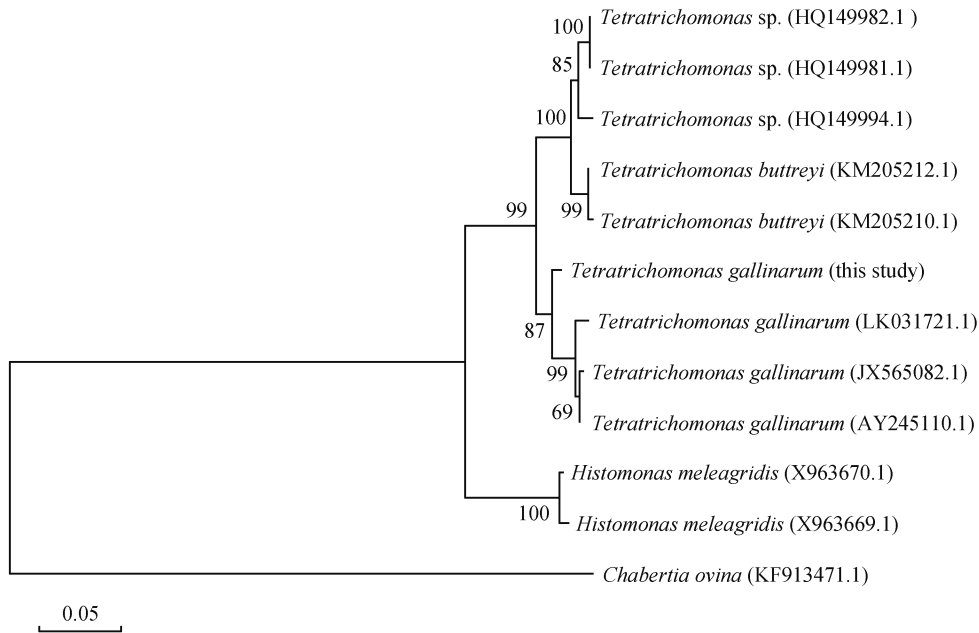


图4 邻接法构建的基于鸡四毛滴虫 18S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on the 18S rRNA gene sequences of *Tetratrichomonas gallinarum*

3 讨论

虽然高通量测序技术已广泛用于细菌群落的研究中,但针对寄生虫群落的高通量测序报道还较少。高通量测序技术只需要粪便样本,而不需要牺牲宿主,也不需要寄生虫形态学知识^[23],通过直接对样品中的核酸进行高通量测序,可全面、快速和准确地检测、鉴定寄生虫,从而为寄生虫的研究提供更多微观视角。在本研究中,研究团队使用 18S rRNA 高通量测序技术在石鸡、红尾斑鸠和金鸽 3 种野生鸟类肠道中检测到 21 种寄生虫。其中,石鸡的鸡异刺线虫检出率最高,为 60.00%,这可能与石鸡的集群活动有关。鸡异刺线虫常与组织滴虫混合感染引起宿主盲肠肝炎,对鸟类健康产生严重影响^[24]。目前,石鸡感染鸡异刺线虫的情况在国内外虽有报道^[25-26],但未对感染的鸡异刺线虫作分类研究。因此,本研究通过剖检法从石鸡盲肠中采集鸡异刺线虫进行形态学和分子生物学鉴定,以期为其分类提供参考依据。经形态学观察发现,石鸡源异刺线虫与已报道的鸡异刺线虫的形态、结构和大小相符。同源性分析发现,本次检出的石鸡源异刺线虫与四川鸡异刺线虫相似性最高。系统进化树分析表明,石鸡源异刺线虫与已报道的鸡异刺线虫存在一定差异,均不在同一分支上,推测可能是不同宿主来源的异刺线虫的

基因序列存在一定差异,也可能是异刺线虫随宿主迁移所致^[24]。鸡异刺线虫生活史简单,不需要中间宿主,在新的环境中易感染其他宿主,已有研究证明宿主迁移可影响寄生虫的基因交流^[27-28]。

石鸡、红尾斑鸠和金鸽肠道寄生虫检出种类差异较大,主要原因可能是宿主种类、栖息地和饮食习性等不同,即宿主的生态位不同。例如,艾美耳属(*Eimeria*)球虫感染主要与宿主特异性相关^[29]。鹤艾美耳球虫和瑞氏艾美耳球虫主要感染鹤科(*Gruidae*)鸟类^[30],包括黑颈鹤(*Grus nigricollis*)^[31]、白头鹤(*G. monacha*)^[32]和白枕鹤(*G. vipio*)^[33]等。然而,最近的研究发现,多种艾美耳属球虫感染同一宿主也很常见,这表明艾美耳属球虫的宿主特异性并没有之前认为的那么严格^[34]。例如,Zahedi *et al.*^[34]在坎亚纳野生动物康复中心的一只澳洲斑蛎鹬(*Haematopus longirostris*)体内鉴定出瑞氏艾美耳球虫。澳洲斑蛎鹬为鸻形目(Charadriiformes)蛎鹬科(Haematopodidae),在其粪便中检测到瑞氏艾美耳球虫可能是艾美耳属能感染不同属甚至不同科的宿主,也有可能是污染或机械传播导致。本研究首次在金鸽粪便中鉴定到鹤艾美耳球虫和瑞氏艾美耳球虫,推测可能是金鸽通过摄食从环境中感染了这类寄生虫,因为金鸽与鹤科鸟类的栖息环境相似,且潮湿环境更有利于艾美耳属球虫卵囊的存活,为艾美耳属

球虫的机械传播提供了有利条件。同样,红尾斑鸠体内检出的诺氏等孢球虫(*Isoospora robini*)与上述两种球虫同属于艾美耳科,也可能是红尾斑鸠在饮水过程中被感染。

石鸡和红尾斑鸠检出了同一种簇虫,其来源可能与鸟类的食物——蚯蚓有关。因为大部分簇虫是寄生在蚯蚓的贮精囊或精漏斗中,有时也寄生在体腔内^[35]。红尾斑鸠体内检出率最高的双三齿线虫,其来源也可能与栖息地和饮食习惯有关。蚱蜢为直翅目(Orthoptera),是双三齿线虫的主要中间宿主^[36],且多生活在开放的草地、农田和森林地区,这与红尾斑鸠的栖息环境相似,因此极易被红尾斑鸠捕食而导致感染该类寄生虫。同样,斜吻棘头虫(*Plagiorhynchus cylindraceus*)的感染,也是鸟类通过摄食该寄生虫的中间宿主,如寻常球鼠妇(*Armadillidium vulgare*)发生的^[37]。这种小型节肢动物在双三齿线虫和斜吻棘头虫的生命周期中扮演着关键角色^[38-39],为它们提供了一个必要的发育环境,直到它们被最终宿主(通常是鸟类)摄食,才能完成其生命周期的下一个阶段。斜吻棘头虫最初起源于欧洲,现已被引入到东亚、北美、南非和澳大利亚。该寄生虫在新范围内的建立主要依赖于横跨大陆的鸣禽类鸟类的引入,例如乌鸫(*Turdus mandarinus*)^[40]。因此,加强对红尾斑鸠和金鸽迁徙停歇点的寄生虫监测,深入研究其生命周期、传播途径和对宿主的影响,可为制定有效的鸟类保护措施提供依据。

除了鸟类之间的寄生虫传播,本研究还提示该地区存在人禽共患寄生虫病的潜在风险,例如,在石鸡中检测到四毛滴虫,通过同源性分析和系统进化树分析,发现该四毛滴虫与越南鸡四毛滴虫相似性最高。关于鸡四毛滴虫在鸟类中的致病性,还存在一些争议^[41-42]。然而,最近的一些研究鉴定了从人类分离出的四毛滴虫菌株为鸡四毛滴虫或类鸡四毛滴虫,这表明鸡四毛滴虫具有人禽共患的潜力^[43-45],且在金鸽体内检出的2种四毛滴虫的同科物种也可能存在人禽共患风险。因此,未来需特别重视石鸡等鸟类滴虫类的感染情况,加强对其病原生物学和流行病学的研究。

本研究主要基于高通量测序技术,初步探讨了不同生态位的鸟类宿主对肠道寄生虫的影响。3种鸟类肠道中检出的寄生虫种类差异明显,主要原因可归结为3个宿主特定的生态位差异。本研究共发

现21种寄生虫,其中多种寄生虫在其鸟类宿主中为首次发现,填补了我国在这3种鸟类肠道寄生虫感染数据方面的空白,同时也为研究不同生态类群鸟类的肠道寄生虫感染情况提供了参考。

参考文献:

- [1] LEUNG T L F, KOPRIVNIKAR J. Nematode parasite diversity in birds: the role of host ecology, life history and migration[J]. *Journal of Animal Ecology*, 2016, 85(6): 1471-1480.
- [2] 龚治忠, 李清月, 汪冲, 等. 升金湖越冬小白额雁和同域家鸭的肠道寄生虫多样性研究[J]. *生物学杂志*, 2021, 38(6): 49-53.
GONG Z Z, LI Q Y, WANG C, *et al.* Intestinal parasite diversity of the wintering lesser white-fronted goose (*Anser erythropus*) and sympatric poultry ducks in Shengjin Lake, China[J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(6): 49-53.
- [3] FELSŐ B, RÓZSA L. Reduced taxonomic richness of lice (Insecta: Phthiraptera) in diving birds[J]. *The Journal of Parasitology*, 2006, 92(4): 867-869.
- [4] RZĄD I, SITKO J, SAŁAMATIN R, *et al.* Helminth community structure study on urban and forest blackbird (*Turdus merula* L.) populations in relation to seasonal bird migration on the south Baltic Sea coast (NW Poland)[J]. *Helminthologia*, 2014, 51(2): 117-129.
- [5] KARL S. Association of helminth infections and food consumption in common eiders *Somateria mollissima* in Iceland[J]. *Journal of Sea Research*, 2015, 104: 41-50.
- [6] DROBNEY R D, TRAIN C T, FREDRICKSON L H. Dynamics of the plathyhelminth fauna of wood ducks in relation to food habits and reproductive state[J]. *The Journal of Parasitology*, 1983, 69(2): 375-380.
- [7] SANMARTÍN M L, ÁLVAREZ F, BARREIRO G, *et al.* Helminth fauna of Falconiform and Strigiform birds of prey in Galicia, northwest Spain [J]. *Parasitology Research*, 2004, 92(3): 255-263.
- [8] VIOLANTE-GONZÁLEZ J, MONKS S, GIL-GUERRERO S, *et al.* Helminth communities of two species of piscivorous birds, *Ardea alba* (Linnaeus) and *Nyctanassa violacea* (Gmelin) (Ciconiiformes: Ardeidae), in two coastal lagoons from Guerrero state, Mexico[J]. *Parasitology Research*, 2012, 111(1): 309-315.
- [9] MCLAUGHLIN J D, MCGURK B P. An analysis of gizzard worm infections in fall migrant ducks at Delta, Manitoba, Canada[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1987, 65(6): 1470-1477.
- [10] APONTE V, LOCKE S A, GENTES M L, *et al.* Effect of habitat use and diet on the gastrointestinal parasite community of an avian omnivore from an urbanized environment [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2014, 92(7): 629-636.
- [11] KOPRIVNIKAR J, LEUNG T L F. Flying with diverse passen-

- gers: greater richness of parasitic nematodes in migratory birds [J]. *Oikos*, 2015, 124(4): 399-405.
- [12] AULD S K J R, TINSLEY M C. The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites: linking phenomena with mechanisms [J]. *Heredity*, 2015, 114(2): 125-132.
- [13] RICKLEFS R E, FALLON S M, BERMINGHAM E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites [J]. *Systematic Biology*, 2004, 53(1): 111-119.
- [14] SVIHUS B. Function of the digestive system [J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2014, 23(2): 306-314.
- [15] ABBAS A, IQBAL Z, ABBAS R Z, *et al.* *In-vitro* anticoccidial potential of *Saccharum officinarum* extract against *Eimeria* oocysts [J]. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2015, 14(6): 456-461.
- [16] QI Y P, WANG H H, GUO W N, *et al.* Surveillance of multiple subtype specific antibodies against avian influenza viruses among egg yolk in wild ducks from northeast China, 2017-2019 [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 152: 104618.
- [17] 袁海龙, 李辉民. 青铜峡库区湿地自然保护区鸟类图谱 [M]. 银川: 阳光出版社, 2022: 1.
YUAN H L, LI H M. Bird atlas of Qingtongxia Reservoir Wetland Nature Reserve [M]. Yinchuan: Sunshine Press, 2022: 1.
- [18] 赵正阶. 中国鸟类志: 下卷: 雀形目 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001: 346-348.
ZHAO Z J. A handbook of the birds of China: Vol. II: Passeriformes [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2001: 346-348.
- [19] 旭日干. 内蒙古动物志: 第3卷: 鸟纲: 非雀形目 [M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 2013: 403-404.
XU R G. Fauna Inner Mongolia: Vol. III: Aves: non-Passeriformes [M]. Hohhot: Inner Mongolia University Press, 2013: 403-404.
- [20] STOECK T, BASS D, NEBEL M, *et al.* Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(Suppl. 1): 21-31.
- [21] 卢俊杰, 靳家声. 人和动物寄生线虫图谱 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 51-58.
LU J J, JIN J S. Atlas of human and animal parasitic nematodes [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002: 51-58.
- [22] 田水凤. 一例鸡异刺线虫病的诊断与防治 [J]. *湖南畜牧兽医*, 2022(2): 19-20.
TIAN S F. Diagnosis, prevention, and treatment of a case of heterakiasis in chickens [J]. *Hunan Journal of Animal Science & Veterinary Medicine*, 2022(2): 19-20.
- [23] TANAKA R, HINO A, TSAI I J, *et al.* Assessment of helminth biodiversity in wild rats using 18S rDNA based metagenomics [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110769.
- [24] 刘路瑶, 杨聪山, 章翔, 等. 孔雀源异刺线虫的形态学特征及分子鉴定 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2021, 39(6): 816-820; 831.
LIU L Y, YANG C S, ZHANG X, *et al.* Morphological characteristics and molecular identification of *Heterakis* sp. peacock origin [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2021, 39(6): 816-820; 831.
- [25] NOOR R, JAVID A, HUSSAIN A, *et al.* Prevalence of parasites in selected captive bird species [J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 84: e254251.
- [26] 邓波. 石鸡盲肠肝炎的诊断与防治 [J]. *中国畜禽种业*, 2011, 7(8): 138.
DENG B. Diagnosis and prevention of chukar partridge cecal hepatitis [J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2011, 7(8): 138.
- [27] BLOUIN M S, YOWELL C A, COURTNEY C H, *et al.* Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes [J]. *Genetics*, 1995, 141(3): 1007-1014.
- [28] TROUT R T, STEELMAN C D, SZALANSKI A L. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2010, 47(2): 152-161.
- [29] BANGOURA B, BARDSLEY K D. Ruminant coccidiosis [J]. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2020, 36(1): 187-203.
- [30] CARPENTER J W, SPRAKER T R, NOVILLA M N. Disseminated visceral coccidiosis in whooping cranes [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1980, 177(9): 845-848.
- [31] LIANG Y, ZHAO Z J, HU J J, *et al.* Prevalence and genetic characterization of eimeriid *Coccidia* from feces of black-necked cranes, *Grus nigricollis* [J]. *Parasitology Research*, 2018, 117(3): 869-874.
- [32] HUANG W, ZHOU L Z, ZHAO N N. Temporal-spatial patterns of intestinal parasites of the hooded crane (*Grus monacha*) wintering in lakes of the middle and Lower Yangtze River floodplain [J]. *Avian Research*, 2014, 5: 6.
- [33] MATSUBAYASHI M, TAKAMI K, ABE N, *et al.* Molecular characterization of crane *Coccidia*, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes [J]. *Parasitology Research*, 2005, 97(1): 80-83.
- [34] ZAHEDI A, LIU D D, YANG R C, *et al.* Next-generation sequencing amplicon analysis of the genetic diversity of *Eimeria* populations in livestock and wildlife samples from Australia [J]. *Parasitology Research*, 2023, 122(2): 615-624.
- [35] 张德宁, 许智芳. 蚯蚓的寄生虫 [J]. *生物学通报*, 1994, 29(12): 6-7.
ZHANG D N, XU Z F. Parasites of earthworms [J]. *Bulletin of Biology*, 1994, 29(12): 6-7.

- [36] CAWTHORN R J, ANDERSON R C. Development of *Diplotriana tricuspis* (Nematoda: Diplotrianaidea), a parasite of Corvidae, in intermediate and definitive hosts [J]. Canadian Journal of Zoology, 1980, 58(1): 94-108.
- [37] SKUBALLA J, TARASCHEWSKI H, PETNEY T N, et al. The avian acanthocephalan *Plagiorhynchus cylindraceus* (Palaeacanthocephala) parasitizing the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Europe and New Zealand [J]. Parasitology Research, 2010, 106(2): 431-437.
- [38] STERNER M C, III, COLE R A. *Diplotriana*, *Serratospiculum*, and *Serratospiculoides* [M]//ATKINSON C T, THOMAS N J, HUNTER D B. Parasitic diseases of wild birds. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2008: 434-438.
- [39] SCHMIDT G D, OLSEN O W. Life cycle and development of *Prosthorhynchus formosus* (Van Cleave, 1918) Travassos, 1926, an acanthocephalan parasite of birds [J]. The Journal of Parasitology, 1964, 50(6): 721-730.
- [40] SMALES L R. *Plagiorhynchus (Prosthorhynchus) cylindraceus* (Goeze, 1782) Schmidt and Kuntz, 1966, from the Australian bandicoots, *Perameles gunnii* Gray, 1838, and *Isoodon obesulus* (Shaw, 1797) [J]. The Journal of Parasitology, 1988, 74(6): 1062-1064.
- [41] ARABKHAZAEI F, MADANI S A, GHORBANI A. Parasitological and molecular survey of scattered parasitism by trichomonads in some avian species in Iran [J]. Avian Pathology, 2020, 49(1): 47-55.
- [42] GRUNENWALD C, SIDOR I, MICKLEY R, et al. *Tetratrichomonas* and *Trichomonas* spp. -associated disease in free-ranging common eiders (*Somateria mollissima*) from Wellfleet Bay, MA and description of ITS1 region genotypes [J]. Avian Diseases, 2018, 62(1): 117-123.
- [43] KUTISOVA K, KULDA J, CEPICKA I, et al. Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans [J]. Parasitology, 2005, 131(Pt 3): 309-319.
- [44] MARITZ J M, LAND K M, CARLTON J M, et al. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? [J]. Trends in Parasitology, 2014, 30(7): 333-341.
- [45] MANTINI C, SOUPPART L, NOËL C, et al. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(7): 2336-2339.