

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.06.002

赵春霖, 王鹏, 杨松, 等. 温度驯化对黑眶蟾蜍热耐受及口腔菌群的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(6): 12-24.

温度驯化对黑眶蟾蜍热耐受及口腔菌群的影响

赵春霖^{1,2}, 王鹏¹, 杨松¹, 巩元勇^{1,2}, 邓建梅¹,
赵丽华^{1,2}, 郑毅^{1,2}, 闫飞¹, 赵天³

1. 攀枝花学院 生物与化学工程学院/农学院, 四川 攀枝花 617000;

2. 干热河谷特色生物资源开发四川省高校重点实验室, 四川 攀枝花 617000;

3. 西南大学 水产学院, 重庆 400715

摘要: 温度变化对两栖动物的生理响应和微生物生态系统具有重要意义。通过探讨不同驯化温度对黑眶蟾蜍 (*Duttaphrynus melanostictus*) 热耐受性及口腔菌群多样性的影响, 在 19 °C 和 31 °C 条件下对黑眶蟾蜍进行 4 周驯化, 测定其生长趋势、临界低温 (CT_{min}) 和临界高温 (CT_{max}), 并通过 α 多样性、 β 多样性及主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 评估了口腔菌群的组成与结构。结果显示: 驯化温度对黑眶蟾蜍质量和体长无显著影响, 但 31 °C 驯化显著提高了 CT_{min} , 增强了低温耐受性, 而对 CT_{max} 无显著影响。此外, CT_{max} 与质量呈显著正相关, CT_{min} 与质量无显著相关性。在口腔菌群组成上, 不同温度驯化组在门和科水平上未表现出明显组成差异。尽管 α 多样性分析未见显著差异, 但 β 多样性和 PCoA 分析表明, 驯化温度显著影响菌群结构。综上所述, 不同驯化温度显著影响黑眶蟾蜍的热耐受性, 并通过改变其口腔菌群的结构, 促进其对温度变化的适应, 为气候变化背景下温度波动对两栖动物生理适应及微生态系统潜在影响研究提供了理论依据。

关键词: 黑眶蟾蜍; 温度驯化; 热耐受性; 临界温度; 口腔菌群

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A

文章编号: 1673-9868(2025)06-012-13

开放科学(资源服务)标识码 (OSID):



Effects of Temperature Acclimation on Thermal Tolerance and Oral Microbiota of *Duttaphrynus melanostictus*

ZHAO Chunlin^{1,2}, WANG Peng¹, YANG Song¹,
GONG Yuanyong^{1,2}, DENG Jianmei¹, ZHAO Lihua^{1,2},
ZHENG Yi^{1,2}, YAN Fei¹, ZHAO Tian³

收稿日期: 2025-01-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32370553); 干热河谷特色生物资源开发四川省高校重点实验室项目(GR-2023-C-01); 攀枝花学院博士科研启动基金项目(XJ2022000302)。

作者简介: 赵春霖, 博士, 讲师, 主要从事两栖爬行动物生态学和保护生物学研究。

1. College of Biological and Chemical Engineering/College of Agriculture, Panzihua University, Panzihua Sichuan 617000, China;
2. Key Laboratory of Dry-Hot Valley Characteristic Bio-Resources Development at University of Sichuan Province, Panzihua Sichuan 617000, China;
3. College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Temperature fluctuations have significant implications for the physiological responses of amphibians and their associated microbial ecosystems. In this context, this study examines the effects of different acclimation temperatures on the thermal tolerance and oral microbiome diversity of the black-spined toad (*Duttaphrynus melanostictus*). The acclimation of toads was carried out at 19 °C and 31 °C respectively for four weeks, and subsequently, their growth trends, critical thermal minimum (CT_{min}), and critical thermal maximum (CT_{max}) were measured. Oral microbiome composition and structure were assessed using α -diversity, β -diversity, and Principal Coordinate Analysis (PCoA). The results demonstrated that acclimation temperature had no significant effect on body weight or length. However, acclimation at 31 °C significantly increased CT_{min} , thereby enhancing the cold tolerance of the toads, with no significant effect on CT_{max} . Furthermore, CT_{max} was positively correlated with body weight, while CT_{min} showed no significant correlation. In terms of microbiome composition, no significant differences were observed at the phylum and family levels among groups acclimated to different temperatures. Although α -diversity did not show significant changes, but β -diversity and PCoA analysis indicated that acclimation temperature significantly influenced microbiome structure. Taken together, these findings indicate that different acclimation temperatures significantly impact the thermal tolerance of *D. melanostictus*, facilitating temperature adaptation by altering oral microbiome structure. Overall, this study provides important theoretical insights into how temperature fluctuations associated with climate change may affect the survival and adaptability of amphibians and their microbial ecosystems.

Key words: *Duttaphrynus melanostictus*; temperature acclimation; thermal tolerance; critical temperature; oral microbiome

当前,全球气候变化加剧导致极端温度事件频繁发生,给变温动物的生存带来了前所未有的挑战^[1-2]。作为影响变温动物生理和行为(如运动、摄食、生长、免疫等)的关键非生物因子,温度对其生存至关重要^[2-3]。然而,变温动物对环境温度的耐受力具有一定限度,长期暴露于高温环境可能导致生理损伤甚至死亡^[4-5]。在适宜的温度范围内,变温动物可以通过短期热驯化建立热生理补偿机制,以适应热环境^[6],这种机制在不同物种之间存在差异^[7-9]。例如,一些物种在低温驯化下具备较大的热耐受范围^[10-11],而另一些种类则在中等温度驯化下具有较高的热耐受能力^[12-13]。对于无尾两栖动物而言,由于其生活史从水生到半陆生或陆生的转变,需要适应较广的温度变化范围,因此其热耐受能力对种群生存尤为重要^[14-15]。

温度是调节宿主微生物群落丰富度的关键因素之一^[16-18]。研究表明,宿主微生物群落对环境变化具有显著响应^[19-20],温度变化可直接或间接影响微生物的生长与代谢速率,从而改变宿主微生物群落的结构和功能^[10, 21-22]。例如,口腔和肠道微生物在宿主的消化、免疫和代谢过程中发挥重要作用,并通过协同作用提高宿主对环境变化的适应能力^[23-25]。尽管已有研究关注两栖动物肠道微生物对温度变化的响应^[26-27],但口腔微生物对温度变化的响应尚未得到充分研究。

黑眶蟾蜍(*Duttaphrynus melanostictus*)属于两栖纲(Amphibia)、无尾目(Anura)、蟾蜍科(Bufonidae)和头棱蟾属(*Duttaphrynus*)^[28]。该物种主要分布在中国南方地区,尤其在四川、云南和广西较为常见,

攀枝花市也有较多分布。黑眶蟾蜍的繁殖期为 5—10 月, 主要以植物害虫为食, 在维护自然生态平衡方面发挥重要作用^[29]。由于行动缓慢, 该物种较易受环境变化的影响^[28]。此外, 黑眶蟾蜍的蟾酥、蟾衣等部位具有较高的药用价值^[30]。当前关于该物种的研究主要集中于盐度、酸碱度、重金属等环境因子对蝌蚪的适应性影响以及其药用价值^[29, 31-34], 而成体黑眶蟾蜍的热耐受性及口腔菌群对温度变化的响应鲜见报道。本研究基于 2 种恒定温度(低温: 19 °C; 高温: 31 °C)探讨黑眶蟾蜍的热耐受性和口腔菌群变化, 目标为: ① 评估温度驯化对黑眶蟾蜍热耐受性的影响, 明确临界高温(CT_{max})和临界低温(CT_{min})在不同温度条件下的变化趋势; ② 研究口腔菌群在不同驯化温度下的多样性和结构变化, 探讨微生物群落对温度适应的潜在作用。本研究为全球气候变化背景下无尾两栖类的种群分布及生物多样性保护提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以黑眶蟾蜍成体作为研究对象。2024 年 6 月底, 在攀枝花学院校园内的一个持久性池塘中采集了 24 只成体黑眶蟾蜍, 并将其送至学院两栖爬行动物实验室。实验个体被随机分配至 3 个塑料箱中(尺寸: 58 cm×42 cm×33 cm), 每箱 8 只。个体在实验室环境中适应 3 d, 期间提供充足的食物, 饵料为面包虫(*Tenebrio molitor*)。

1.2 温度驯化

适应期结束后, 使用皮尺(精度±0.1 cm)测量黑眶蟾蜍的体长(从吻端到体后端的长度), 并用电子秤(精度±0.01 g)称取质量。初始平均体长为(6.70±0.12)cm, 平均质量为(24.80±1.37)g。随后, 将个体随机分为 2 组(19 °C 组, N=12; 31 °C 组, N=12)。每组进一步细分为 6 个小组(每组 2 只, 19 °C 组和 31 °C 组各 6 组)。将每只个体放入已标记的塑料饲养盒中(尺寸: 30 cm×23 cm×10 cm), 盒底加入暴晒过的自来水, 水深约 1 cm, 以保持适宜湿度。31 °C 组放置在温控 PVC 恒温内, 温度保持在(31.0±0.5) °C; 19 °C 组置于空调控制的实验室中, 温度设定为(19.0±0.5) °C。驯化期间, 每隔 1 d 投喂面包虫, 并更换水, 投喂时间固定为早上 9:00, 光照周期为 12L:12D。驯化持续 4 周, 每周测量并记录动物的体长和质量。为确保分组的均衡性, 实验开始前对 2 组的初始体长和质量进行了统计分析。根据 Mann-Whitney 检验结果, 2 组体长和质量无显著差异(质量: $W=45.5$, $p=0.7902$; 体长: $W=34$, $p=0.2523$), 说明随机分组有效平衡了个体大小的影响。

1.3 热耐受性测定

驯化期结束后, 选取生命体征正常的黑眶蟾蜍个体(N=20, 19 °C 组 11 只, 31 °C 组 9 只), 采用临界温度法(CT_{max} 和 CT_{min})测定其热耐受性。在实验前, 动物禁食 24 h, 并测量质量和体长。临界高温(CT_{max})通过数显恒温水浴锅(型号: HH-600, 中国)测定。实验开始时, 水温设定为 20 °C, 并以 0.95 °C/min 的速率升温。水浴锅用隔网分为左右两部分, 每部分容纳 2 只个体同时测试。临界低温(CT_{min})在连接外部冷水机(型号: AL-500, 中国)的鱼缸(尺寸: 50 cm×26 cm×30 cm)中测定。实验开始时水温设定为 20 °C, 并以 0.28 °C/min 的速率降温, 同样使用隔网分隔鱼缸, 容纳 2 只个体。实验过程中, 使用水银温度计实时监控水温。每隔 1 min, 实验员用玻璃棒翻转动物, 观察其反应, 直到动物失去翻正反应。此时的水温即为 CT_{max} 或 CT_{min} 。测定结束后, 立即将动物放入常温水中恢复。完成 CT_{max} 测定后, 各组动物返回原驯化环境继续驯化 1 周, 再进行 CT_{min} 测定。实验过程中, 使用数字温度计(精度±0.1 °C)实时监测水温变化。

1.4 口腔微生物采样

在热耐受性测定结束后, 将动物放回相应的驯化环境恢复 1 周。随后, 每组随机选取 5 只动物进行口腔微生物采样。取样前, 测量并记录每只动物的质量和体长。所有取样操作均在无菌操作台上进行, 实验员全程佩戴医用口罩和一次性乳胶手套。正式采样前, 使用 75% 酒精对周围环境及取样人员进行全面消毒。采样时, 使用一次性无菌拭子轻轻拭取动物的口腔黏液, 拭子随即放入含 75% 酒

精的 2 mL 无菌离心管中,并迅速存入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。样品通过液氮罐送至天津极智基因科技有限公司进行 16S rRNA 测序。

采用 CTAB 法提取口腔微生物总 DNA,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的纯度与浓度。凝胶以 $1\times$ TAE 缓冲液制备,添加 GelRed 染色剂。将 $5\text{ }\mu\text{L}$ DNA 样本与 $1\text{ }\mu\text{L}$ $6\times$ 上样缓冲液混合后上样,电泳条件设定为 120 V , 30 min 。使用 Bio-Rad Gel Doc XR+成像系统观察条带完整性,并与 λ -HindIII DNA Marker 对比,确保样品无明显降解。随后,采用 Nano Drop 2000(Thermo Fisher Scientific)测定 A260/A280 比值,确保所有样本比值在 $1.8\sim 2.0$,排除蛋白或其他污染物的影响,并使用 Qubit 3.0 荧光定量仪测定 DNA 浓度,确保符合测序要求。接着,以 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 907R(5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')为引物,使用 New England Biolabs 公司 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 及高效高保真酶对细菌 16S rRNA V4-V5 区进行 PCR 扩增。PCR 反应条件如下: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min ; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ,共进行 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min 。使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性和完整性,并对样品进行定量,以确保文库均一性。PCR 产物检测后,按等量混合,使用 NEBNext[®] Ultra[™] II DNA Library Prep Kit 构建文库。文库构建前,通过 Qubit 和 Q-PCR 检测文库浓度,确保足够的 DNA 量进入 Illumina NovaSeq 6000 平台进行 PE 250 测序。测序后,对原始数据进行质量控制,包括去除低质量序列、接头序列和嵌合序列(Chimeric Reads),以保证数据的可靠性。所有测序工作由天津极智基因科技有限公司完成。

1.5 数据分析与处理

1.5.1 热耐受性数据分析

驯化反应率(Acclimation Response Ratios, ARR)是衡量动物驯化能力的关键指标,也是评估机体热适应可塑性的一个重要参数^[35-36]。以 $CT_{\max}$ 为例,ARR 的计算公式为:

$$\alpha_{\text{ARR}} = \frac{\Delta CT_{\max}}{\Delta T}$$

式中: $\Delta CT_{\max}$ 为不同驯化条件下 $CT_{\max}$ 平均值的差值; ΔT 为不同驯化温度之间的差值。

统计分析使用 Rv 4.4.1 软件^[37]进行。首先,使用 Shapiro-Wilk test 检验测试数据正态性,然后采用 Scheirer-Ray-Hare 检验评估温度对黑眶蟾蜍生长发育的主效应,并通过 Spearman 相关性分析测定质量、体长与 $CT_{\max}$ 和 $CT_{\min}$ 之间的关系。接着,使用 Kruskal-Wallis 检验分析不同驯化温度下黑眶蟾蜍 $CT_{\max}$ 和 $CT_{\min}$ 的差异。最后,计算黑眶蟾蜍的驯化反应率。显著性水平设定为 $p=0.05$,所有描述性统计结果均以平均值 $\pm$ 标准误表示。使用 ggplot2 包和 corrplot 包对统计结果进行可视化展示。

1.5.2 口腔微生物数据分析

首先,使用 QIIME2^[38-39]将 OTUs 代表序列与 Silva 数据库进行比对,并通过 RDP classifier 分类器^[40]进行物种注释。接着,利用 Rv 4.4.1 软件中的 phyloseq 包对数据进行整合和标准化处理。随后,计算 α 多样性指标,包括 Observed-species、Shannon 指数和 PD 指数,并使用 dplyr 包进行 Wilcoxon 秩和检验。在 β 多样性分析中,采用 Bray-Curtis 距离进行计算,并使用 vegan 包中的 adonis 函数进行 PERMANOVA 检验分析组间差异。然后,利用 ape 包中的 pcoa 函数进行主坐标分析(Principal Coordinates Analysis, PCoA)。显著性水平设定为 $p=0.05$,最后,使用 ggplot2 包对分析结果进行可视化处理。

2 结果与分析

2.1 驯化温度对黑眶蟾蜍热耐受性的影响

经 $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下分别驯化 4 周,结果显示,驯化温度对黑眶蟾蜍的质量和体长未产生显著影响(表 1)。 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 驯化条件下,动物个体的质量呈现轻微下降(图 1)。黑眶蟾蜍的 $CT_{\max}$ 和 $CT_{\min}$ 与体长无显著相关性, $CT_{\max}$ 与质量呈显著正相关,但 $CT_{\min}$ 与质量无显著相关性(表 1、图 2)。 $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组

黑眶蟾蜍的 $CT_{\min}$ 为 $4.4\text{ }^{\circ}\text{C}$; $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组黑眶蟾蜍的 $CT_{\min}$ 为 $7.03\text{ }^{\circ}\text{C}$, 随着驯化温度的上升, $CT_{\min}$ 显著提高 ($\chi^2=13.152\text{ }0$, $p=0.000\text{ }3$)。 $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组黑眶蟾蜍的 $CT_{\max}$ 值为 $41.70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组黑眶蟾蜍的 $CT_{\max}$ 为 $42.23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $CT_{\max}$ 值不受驯化温度的影响 ($\chi^2=1.307\text{ }5$, $p=0.252\text{ }8$) (图 3)。

表 1 驯化温度对黑眶蟾蜍生长发育的主效应检验结果

因变量	因素	平方和	<i>Df</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
质量	温度	2.525	1	0.018	0.892
体长	温度	363.636	1	2.675	0.102

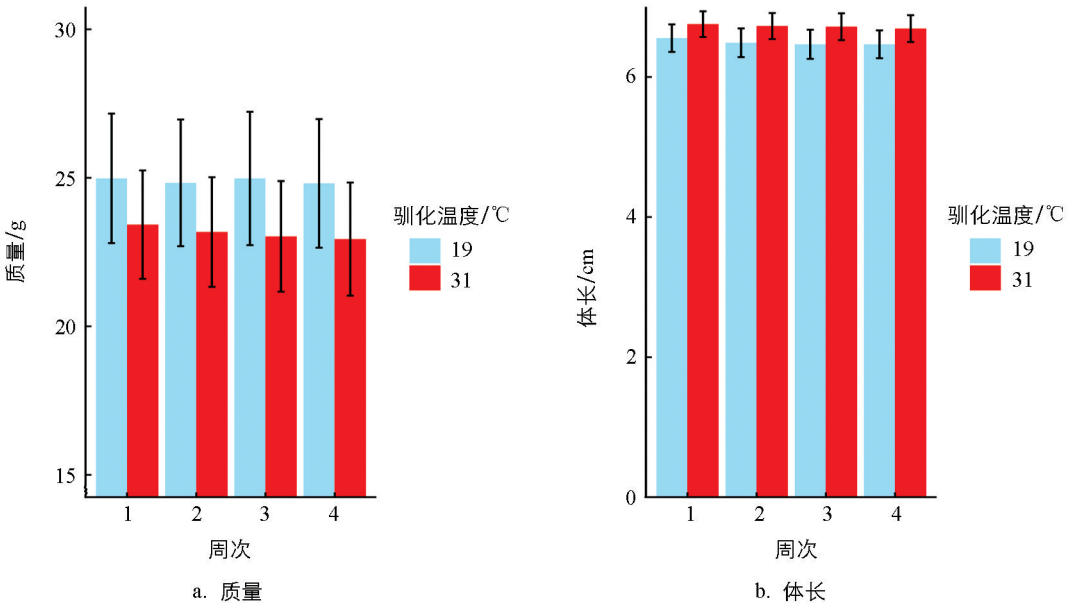


图 1 不同驯化组黑眶蟾蜍的生长趋势

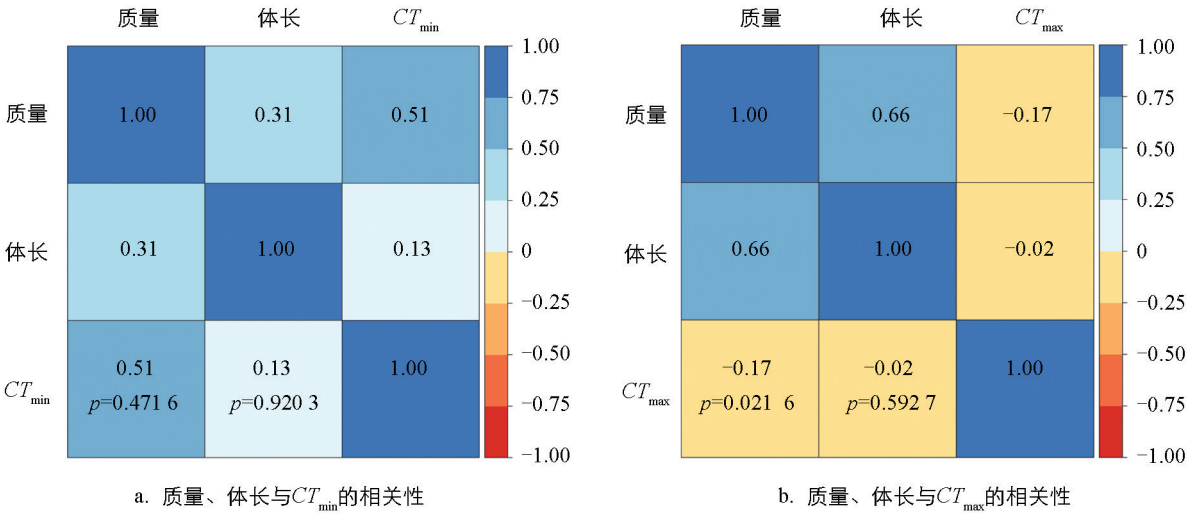


图 2 黑眶蟾蜍质量、体长与临界温度的相关性

2.2 驯化温度对黑眶蟾蜍驯化反应率的影响

研究结果显示, 在 $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 驯化条件下黑眶蟾蜍 $CT_{\min}$ 的驯化反应率高于 $CT_{\max}$ 的驯化反应率。其中, $CT_{\min}$ 的驯化反应率为 0.26 , 表明随着驯化温度的升高, 黑眶蟾蜍的 $CT_{\min}$ 增加; $CT_{\max}$ 的驯化反应率为 0.05 , 表明驯化温度对黑眶蟾蜍的 $CT_{\max}$ 影响较小。

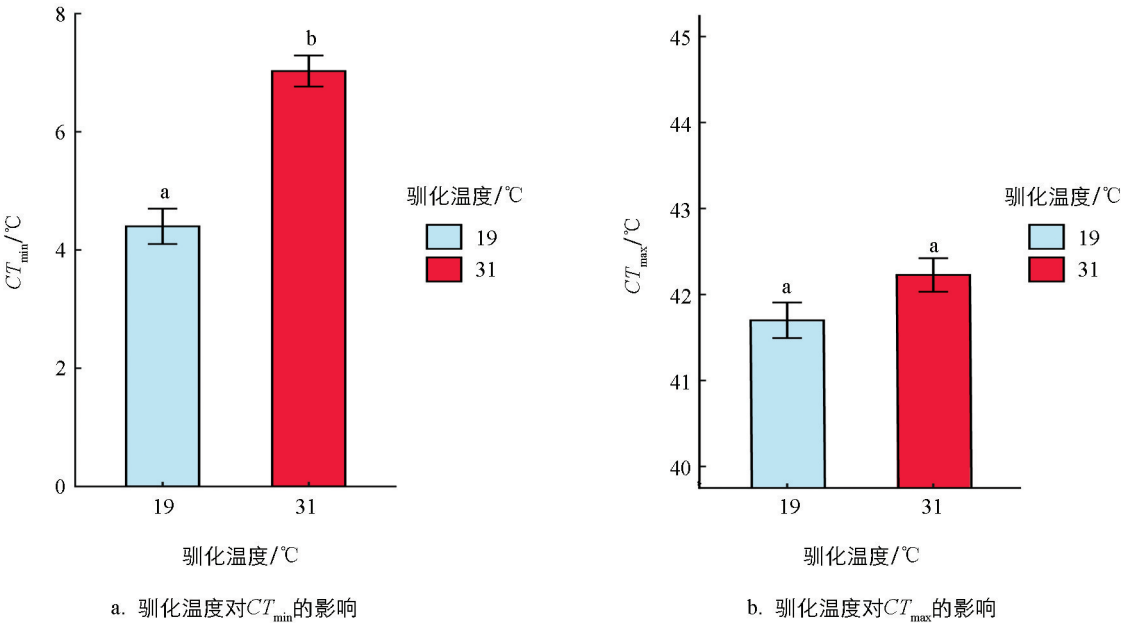
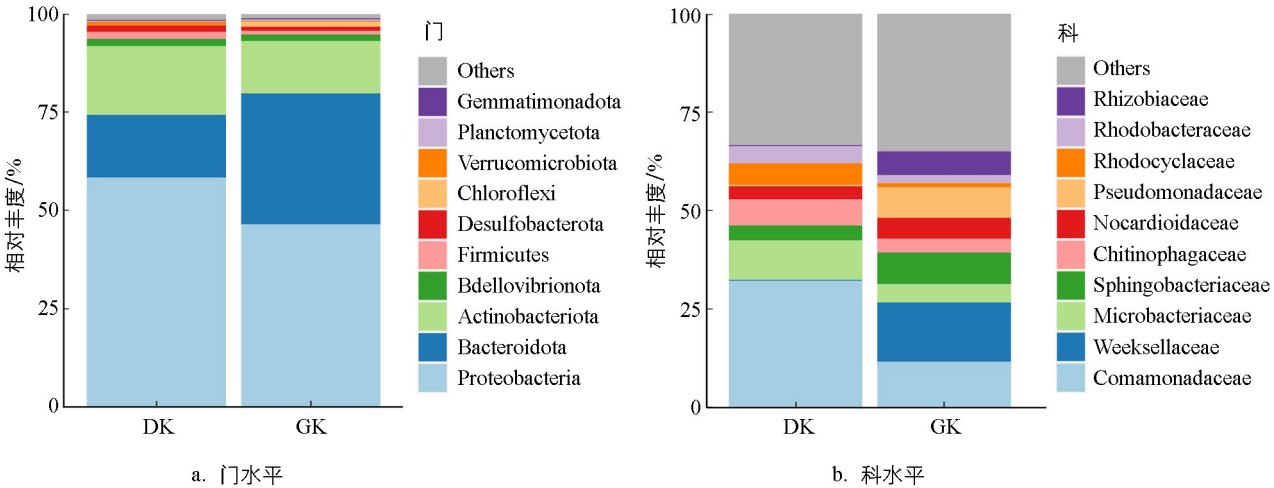


图 3 不同驯化温度对黑眶蟾蜍 CT_{min} 和 CT_{max} 的影响

2.3 不同驯化温度对黑眶蟾蜍口腔菌群的影响

2.3.1 口腔菌群组成

研究结果如图 4 所示,不同温度驯化后,黑眶蟾蜍口腔菌群在门和科水平上的组成未表现出明显差异。在门水平上,19 °C (DK)驯化组和 31 °C 驯化组 (GK)的黑眶蟾蜍口腔菌群主要优势菌门为 Proteobacteria (变形菌门, DK: 58.47%、GK: 46.58%); Bacteroidota(拟杆菌门, DK: 15.98%、GK: 33.26%)和 Actinobacteriota(放线菌门, DK: 17.45%、GK: 13.35%)也占比较高。在科水平上,19 °C 驯化组的黑眶蟾蜍口腔菌群中,相对丰度较高的菌科包括 Comamonadaceae(丛毛单胞菌科, 32.16%)、Microbacteriaceae(微杆菌科, 10.08%)、Chitinophagaceae(噬几丁质菌科, 6.66%)。相比之下,31 °C 驯化组的黑眶蟾蜍口腔菌群中,相对丰度较高的菌科为 Weeksellaceae(威克斯氏菌科, 15.13%)、Comamonadaceae(丛毛单胞菌科, 11.57%)、Sphingobacteriaceae(鞘氨醇杆菌科, 8.06%)、Pseudomonadaceae(假单胞菌科, 7.82%)、Rhizobiaceae(根瘤菌科, 6.04%)。



DK 表示 19 °C 驯化组口腔样品, GK 表示 31 °C 驯化组口腔样品。

图 4 门、科水平下不同温度驯化的黑眶蟾蜍口腔菌群组成

2.3.2 不同温度驯化下黑眶蟾蜍口腔菌群多样性分析

在 α 多样性分析中, Observed-species 结果显示, 19 °C 驯化组 (DK) 的中位数略高于 31 °C 驯化组 (GK), 但两组比较差异不显著 ($p=0.56$), 表明驯化温度对黑眶蟾蜍口腔菌群的物种丰富度影响不大; 同样, 两组间的 Shannon 指数未表现出显著性差异 ($p=0.90$), 这表明在不同温度驯化条件下, 黑眶蟾蜍口腔菌群的物种多样性保持相对稳定; 此外, PD 指数分析结果也显示两组间无显著差异 ($p=0.90$), 表明驯化温度对黑眶蟾蜍口腔菌群的系统发育多样性影响有限(图 5a)。因此, α 多样性分析结果表明, 不同的驯化温度对黑眶蟾蜍口腔菌群的菌群丰富度、多样性及系统发育多样性均未产生显著影响。在 β 多样性分析中, 基于 Bray-Curtis 距离的分析结果显示, 19 °C 驯化组 (DK) 和 31 °C 驯化组 (GK) 之间的口腔菌群组成存在显著差异 ($p=0.03$), 表明不同驯化温度显著改变了黑眶蟾蜍口腔菌群的群落结构(图 5b)。

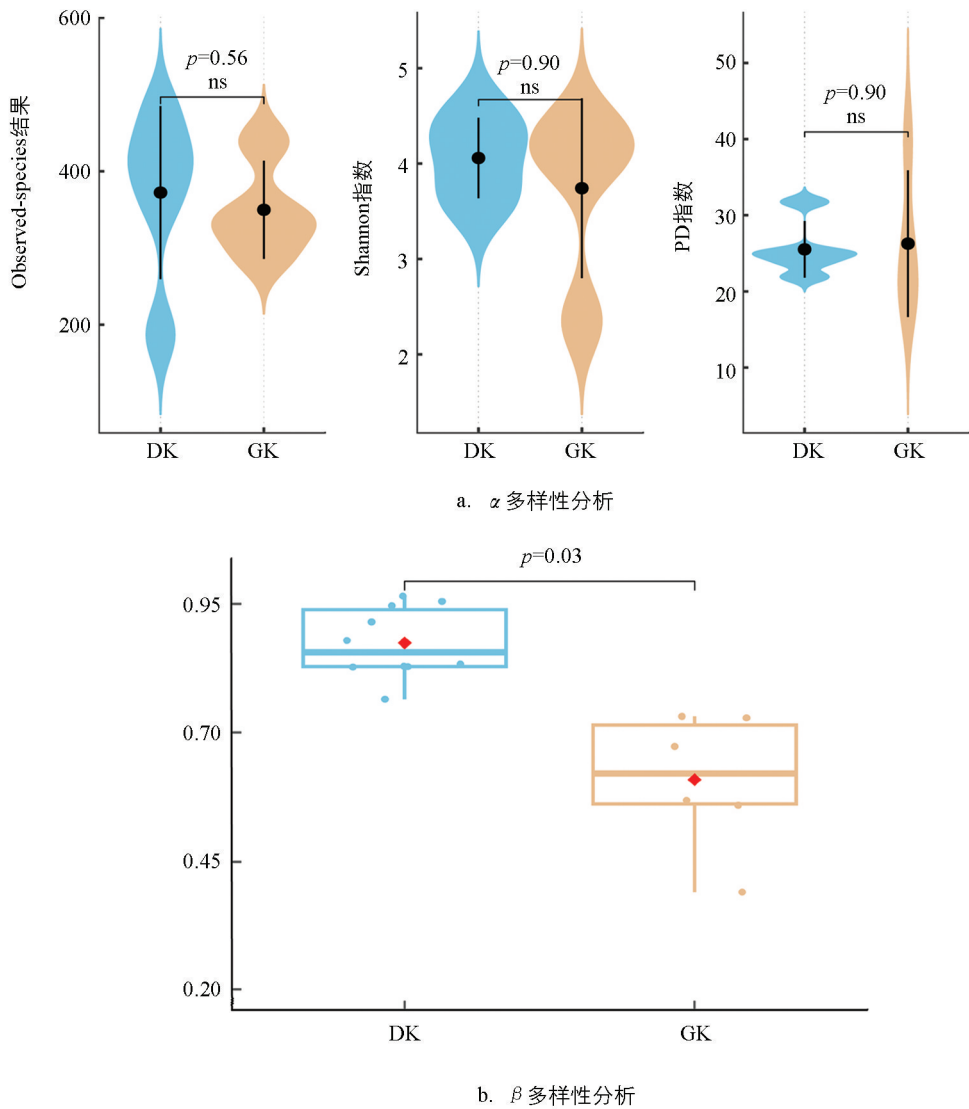


图 5 黑眶蟾蜍口腔菌群多样性分析

2.3.3 不同温度驯化下黑眶蟾蜍口腔菌群相似度分析

主坐标分析结果显示(图 6), 在不同温度驯化条件下, 黑眶蟾蜍口腔菌群的群落结构存在显著差异。PCoA1 和 PCoA2 分别解释了口腔菌群结构总变化的 38%和 14%。19 °C 驯化组 (DK) 和 31 °C 驯化组 (GK) 分别聚集在不同区域, 且两组间的菌群分布相对分离, 表明温度驯化对黑眶蟾蜍口腔菌群组成产生了显

著影响。这一结果与 β 多样性分析一致, 进一步支持了驯化温度在塑造黑眶蟾蜍口腔菌群结构方面的潜在作用。

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 黑眶蟾蜍热耐受性对温度驯化的响应

在 19 °C 和 31 °C 条件下驯化一个月后, 黑眶蟾蜍的质量和体长未发生显著变化, 但 31 °C 驯化组的个体质量略有下降。类似结果也在北蝗蛙 (*Acris crepitans*) 中观察到, 其中 25 °C 驯化的个体质量显著低于 15 °C 驯化的个体^[41]。这种现象符

合温度—体型大小规则(Temperature-Size Rule, TSR), 即温度升高会导致外温动物体型减小^[42], 其原因在于温度升高会增加外温动物的能量需求, 但短期内食物摄入量可能未能同步增加^[43]。因此, 在较高温度下, 能量摄入和消耗之间的不平衡可能导致黑眶蟾蜍质量的轻微下降。在较高温度下, 黑眶蟾蜍体内酶的活性提高, 代谢率和运动能力增强, 但摄取的食物未能完全满足其代谢需求, 导致质量略有下降。类似情况已在其他外温动物中得到证实^[44-45]。此外, 研究还发现, 黑眶蟾蜍的临界耐热温度(CT_{max})随着体质量的增加而升高。对于变温动物, 不同体型的个体比表面积不同, 这会影响其能量效率和热传导能力。因此, 质量较大的个体通常具有更强的热耐受能力, 这一现象在某些鱼类中已有研究证实^[46-47]。

虽然驯化温度对黑眶蟾蜍的临界高温(CT_{max})无显著影响, 但对临界低温(CT_{min})有显著影响, 即低温驯化的个体比高温驯化的个体具有更强的低温耐受力, 反之则不然。这一现象可能与攀枝花市当地干热河谷气候特点有关。该地区年平均气温较高, 夏季温度甚至可达 40 °C^[48], 黑眶蟾蜍可能早已适应了当地的高温环境, 因此驯化温度对其 CT_{max} 的影响不明显。相反, 温度变化对 CT_{min} 的影响较大, 尤其在高温驯化环境中, 黑眶蟾蜍的耐低温能力显著减弱。类似低温耐受的可塑性在其他外温动物中也有报道, 如蟾蜍 (*Rhinella icterica*)^[49]、大西洋白姑鱼 (*Argyrosomus regius*)^[50] 和北美细趾蟾 (*Eleutherodactylus coqui*)^[51]。黑眶蟾蜍的低温耐受可塑性可能是其适应干热河谷环境的一种策略, 通过温度驯化来应对短期的低温暴露。这种表型可塑性可能有助于其在温度变化的栖息地中生存, 但如果出现异常低温天气, 黑眶蟾蜍的生存可能会受到威胁。随着全球气候变化, 极端天气的频发可能对该物种的生存构成更大的挑战。

ARR 反映了外温动物对不同驯化温度变化的生理响应能力。ARR 值越大, 表明动物生理功能对温度变化的可塑性越强^[36, 52]。本研究发现, 黑眶蟾蜍 CT_{min} 的 ARR 值(0.26)显著高于 CT_{max} (0.05), 表明其热耐受在低温(19 °C)时的可塑性较高, 而在高温(31 °C)时的可塑性较低。这个结果与其他变温动物的研究结果相似, 例如, 东方蝾螈 (*Cynops orientalis*)^[53]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[54]、美洲林蛙 (*Bufo marinus*)^[55], 但与一些表现出 CT_{max} 的 ARR 值大于 CT_{min} 的物种有所不同^[7-8, 45]。这种差异反映了不同栖息环境中的动物扩展耐受能力的策略差异, 可能与其所处环境的温度波动模式有关。生活在短期温度波动较大环境中的物种, 可能比生活在温度长期缓慢变化环境中的物种具有更强的抵抗快速温度变化的能力^[56-57]。

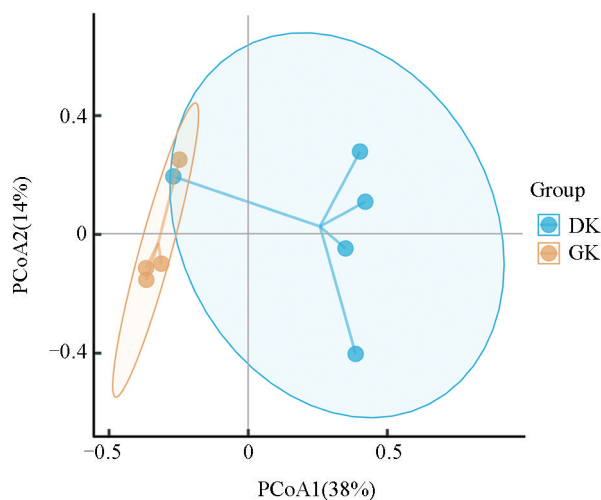


图 6 不同温度驯化下黑眶蟾蜍口腔菌群的主坐标分析

3.1.2 黑眶蟾蜍口腔菌群对温度驯化的响应

两栖动物的基本生理功能直接依赖于环境条件^[58-59],因此其行为、生理和菌群组成极易受到环境温度的显著影响^[4, 26]。近年来,关于两栖动物肠道和皮肤微生物多样性对温度响应的研究逐渐增多^[17, 60-62]。然而,关于温度对两栖动物口腔菌群的影响鲜见报道。本研究发现,黑眶蟾蜍在 19 °C 和 31 °C 驯化条件下的口腔菌群组成在门水平上基本相似,以 Proteobacteria(变形菌门)为主导,其次为 Bacteroidota(拟杆菌门)和 Actinobacteriota(放线菌门),表明驯化温度对黑眶蟾蜍口腔菌群在门水平上的组成影响较小。一方面,Proteobacteria 因其广泛的环境适应性和代谢多样性,能够在不同温度下保持主导地位^[63]。另一方面,Bacteroidota 和 Actinobacteriota 在有机物分解和免疫调节方面具备一定优势,能够在温度波动中保持稳定性^[64-65]。此外,驯化期间食物来源的单一性和稳定性也可能有助于维持口腔菌群的组成稳定性,这一现象在红腹蟾蜍(*Melanophryniscus admirabilis*)的研究中也得到了验证^[66]。在科水平上,不同驯化温度下黑眶蟾蜍口腔菌群的优势菌科存在显著差异。在 19 °C 驯化组中,优势菌科包括 Comamonadaceae(丛毛单胞菌科)、Microbacteriaceae(微杆菌科)和 Chitinophagaceae(噬几丁质菌科)。这些菌科的存在可能与低温环境中两栖动物口腔的生态需求相关。例如,Comamonadaceae 在水生环境中具有较强的有机物分解能力,能够帮助分解口腔中的有机物质,减少有害代谢物的积累^[67]; Microbacteriaceae 以分解复杂的多糖类物质等有机物为主,能够清除口腔中的残留食物和碎屑,为宿主提供有益的代谢产物^[68-69]; Chitinophagaceae 以分解几丁质等硬壳多糖为主,不仅可以清理口腔中可能残留的昆虫外骨骼和其他含几丁质的有机物,提供可利用的营养成分,还可能具有保护宿主免受外源致病菌感染的作用^[70]。相较之下,31 °C 驯化组的优势菌科包括 Weeksellaceae(威克斯氏菌科)和 Pseudomonadaceae(假单胞菌科),这可能与这两类菌的高温适应性及其在高温环境下的特殊代谢功能相关。例如,Weeksellaceae 和 Pseudomonadaceae 在高温环境中具有较强的食物残渣和有机质分解能力,有助于减少宿主口腔中的有机残留物,帮助维持口腔内环境的稳态^[63, 71],并对病原菌具有一定的抑制作用^[72]。

本研究结果表明,尽管 19 °C 和 31 °C 驯化条件下的黑眶蟾蜍的口腔菌群多样性相似,但群落结构存在显著差异。19 °C 驯化组的口腔菌群结构表现出较高的组内变异性,而 31 °C 驯化组的菌群结构较为一致。这可能是环境因素、宿主生理特性及微生物群落动态平衡共同作用的结果。已有研究表明,两栖动物的微生物群落结构常受到环境温度、湿度和水质等因素的显著影响^[73]。此外,黑眶蟾蜍口腔菌群的 α 多样性指标(物种丰富度和均匀度)相似,但宿主免疫反应可能对特定微生物种群的丰度产生影响,进而改变群落结构。相关研究发现,两栖动物在不同发育阶段的微生物群落结构存在显著差异^[74]。在不同环境压力或宿主因素的影响下,黑眶蟾蜍口腔菌群的动态平衡可能发生变化,从而导致口腔菌群群落结构的显著差异。宿主微生物群落在压力环境下会发生结构变化,以适应新的生存条件。例如,两栖动物的皮肤微生物在高温或化学物质暴露下会调整群落结构,以增强其适应性^[74]。总之,这些结果强调了微生物群落的复杂性和适应性,未来研究可进一步探讨验证这些因素对黑眶蟾蜍及其他两栖动物口腔微生物群落的影响。

3.2 结论

本研究探讨了驯化温度对黑眶蟾蜍热耐受性及其口腔菌群的影响,揭示了温度在其生理适应和微生物群落结构中的多重作用。首先,驯化温度显著影响了黑眶蟾蜍的 CT_{min} ,但对 CT_{max} 无显著影响,表明黑眶蟾蜍的热耐受下限较易随环境温度变化而调整,展示出较强的生理适应性。其次, α 多样性分析发现,不同温度驯化下黑眶蟾蜍口腔菌群丰富度和多样性无显著变化,但 β 多样性和 PCoA 分析揭示了不

同温度驯化条件下黑眶蟾蜍口腔菌群结构的显著差异。这些结果表明,温度不仅影响两栖动物的生理适应,还通过改变微生物群落来进一步调控生理功能。随着全球气候变化加剧,温度波动可能对两栖动物的热适应性和微生态系统产生深远影响。不断上升的环境温度可能导致像黑眶蟾蜍等无尾两栖类物种的耐受极限和微生物群落动态发生变化,进而影响其生存能力和生态平衡。因此,本研究不仅为理解温度适应在野外环境中塑造生物多样性提供了新的视角,还为应对气候变化对生物体微生态的潜在影响提供了重要的科学依据。

致谢:感谢攀枝花学院生物与化学工程学院(农学院)何俊江、朱静、周兴华和吴欣翼同学在实验动物采集以及取样过程中提供的帮助,感谢攀枝花学院干热河谷特色生物资源开发四川省高校重点实验室全体成员对文章修改提出的宝贵意见,感谢天津极智基因科技有限公司提供测序服务帮助。

参考文献:

- [1] PÖRTNER H O, FARRELL A P. Physiology and Climate Change [J]. *Science*, 2008, 322(5902): 690-692.
- [2] FICETOLA G F, MAIORANO L. Contrasting Effects of Temperature and Precipitation Change on Amphibian Phenology, Abundance and Performance [J]. *Oecologia*, 2016, 181(3): 683-693.
- [3] CAREY C, ALEXANDER M A. Climate Change and Amphibian Declines: Is there a Link? [J]. *Diversity and Distributions*, 2003, 9(2): 111-121.
- [4] ANGILLETTA M J, NIEWIAROWSKI P H, NAVAS C A. The Evolution of Thermal Physiology in Ectotherms [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2002, 27(4): 249-268.
- [5] LUTTERSCHMIDT W I, HUTCHISON V H. The Critical Thermal Maximum: History and Critique [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1997, 75(10): 1561-1574.
- [6] SHERMAN E, LEVITIS D. Heat Hardening as a Function of Developmental Stage in Larval and Juvenile *Bufo Americanus* and *Xenopus Laevis* [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2003, 28(5): 373-380.
- [7] WU M X, HU L J, DANG W, et al. Effect of Thermal Acclimation on Thermal Preference, Resistance and Locomotor Performance of Hatchling Soft-Shell Turtle [J]. *Current Zoology*, 2013, 59(6): 718-724.
- [8] 施林强, 赵丽华, 马小浩, 等. 泽陆蛙和饰纹姬蛙蝌蚪不同热驯化下选择体温和热耐受性 [J]. *生态学报*, 2012, 32(2): 465-471.
- [9] 王立志, 李晓晨. 恒温驯化对中国林蛙热耐受性的影响 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(5): 748-750.
- [10] LOUDON A H, WOODHAMS D C, PARFREY L W, et al. Microbial Community Dynamics and Effect of Environmental Microbial Reservoirs on Red-Backed Salamanders (*Plethodon Cinereus*) [J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(4): 830-840.
- [11] WANG Z, LU H L, MA L, et al. Differences in Thermal Preference and Tolerance among Three *Phrynocephalus* Lizards (Agamidae) with Different Body Sizes and Habitat Use [J]. *Asian Herpetological Research*, 2013, 4(3): 214-220.
- [12] HUANG S P, HSU Y, TU M C. Thermal Tolerance and Altitudinal Distribution of Two *Sphenomorphus* Lizards in Taiwan [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2006, 31(5): 378-385.
- [13] YANG J, SUN Y Y, AN H, et al. Northern Grass Lizards (*Takydromus Septentrionalis*) from Different Populations Do Not Differ in Thermal Preference and Thermal Tolerance when Acclimated under Identical Thermal Conditions [J]. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2008, 178(3): 343-349.
- [14] 曾丹, 李林, 严峰, 等. 中华鳖 IGF2 和 IGF2R 基因克隆及其功能研究 [J]. *南方农业学报*, 2024, 55(4): 1181-1193.
- [15] SHERMAN E. Ontogenetic Change in Thermal Tolerance of the Toad *Bufo Woodhousii* *Fowleri* [J]. *Comparative Bio-*

- chemistry and Physiology Part A: Physiology, 1980, 65(2): 227-230.
- [16] BESTION E, JACOB S, ZINGER L, et al. Climate Warming Reduces Gut Microbiota Diversity in a Vertebrate Ectotherm [J]. Nature Ecology and Evolution, 2017, 1(6): 161.
- [17] KOHL K D, YAHN J. Effects of Environmental Temperature on the Gut Microbial Communities of Tadpoles [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(5): 1561-1565.
- [18] 郭新羽, 沙玉柱, 蒲小宁, 等. 环境温度对动物肠道微生物菌群影响的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(9): 2858-2866.
- [19] LEGRAND T P R A, CATALANO S R, WOS-OXLEY M L, et al. The Inner Workings of the Outer Surface: Skin and Gill Microbiota as Indicators of Changing Gut Health in Yellowtail Kingfish [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2664.
- [20] ROTHSCCHILD D, WEISSBROD O, BARKAN E, et al. Environment Dominates over Host Genetics in Shaping Human Gut Microbiota [J]. Nature, 2018, 555(7695): 210-215.
- [21] ALBERDI A, AIZPURUA O, BOHMANN K, et al. Do Vertebrate Gut Metagenomes Confer Rapid Ecological Adaptation? [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2016, 31(9): 689-699.
- [22] TROSVIK P, DE MUINCK E J. Ecology of Bacteria in the Human Gastrointestinal Tract-Identification of Keystone and Foundation Taxa [J]. Microbiome, 2015, 3: 44.
- [23] CHEVALIER C, STOJANOVIĆ O, COLIN D J, et al. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold [J]. Cell, 2015, 163(6): 1360-1374.
- [24] KOHL K D, CAREY H V. A Place for Host-Microbe Symbiosis in the Comparative Physiologist's Toolbox [J]. Journal of Experimental Biology, 2016, 219(22): 3496-3504.
- [25] ZANEVELD J R, MCMINDS R, VEGA THURBER R. Stress and Stability: Applying the Anna Karenina Principle to Animal Microbiomes [J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17121.
- [26] FONTAINE S S, NOVARRO A J, KOHL K D. Environmental Temperature Alters the Digestive Performance and Gut Microbiota of a Terrestrial Amphibian [J]. Journal of Experimental Biology, 2018, 221(20): jeb187559.
- [27] ZHU L F, ZHU W, ZHAO T, et al. Environmental Temperatures Affect the Gastrointestinal Microbes of the Chinese Giant Salamander [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 543767.
- [28] 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 中国动物志: 两栖纲(中卷) 无尾目 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [29] 徐大德, 李军, 李方满. 水热环境对黑眶蟾蜍幼体存活的影响 [J]. 生态科学, 2007, 26(1): 59-62.
- [30] 周凡星, 童明慧, 刘娟, 等. 药用动物源蛋白质多肽化学组成和生物活性的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(1): 7-17.
- [31] 陈沃洪, 陈伟庭, 李东风. 三种洗涤剂对黑眶蟾蜍蝌蚪生长发育的影响 [J]. 环境科学与技术, 2006, 29(11): 26-28, 85, 116.
- [32] 樊晓丽. 黑眶蟾蜍的热适应性: 现象与机制 [D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- [33] 王立, 徐剑. 生活污水对黑眶蟾蜍胚胎及蝌蚪发育的影响 [J]. 韶关学院学报, 2012, 33(4): 50-54.
- [34] 徐大德, 罗斯特, 李彩欣. 黑眶蟾蜍蝌蚪的适应性温度研究 [J]. 六盘水师范学院学报, 2020, 32(6): 37-40.
- [35] KELLEY A L. The Role Thermal Physiology Plays in Species Invasion [J]. Conservation Physiology, 2014, 2(1): 45-50.
- [36] XIA J G, MA Y J, FU C, et al. Effects of Temperature Acclimation on the Critical Thermal Limits and Swimming Performance of *Brachymystax Lenok Tsinlingensis*: A Threatened Fish in Qinling Mountain Region of China [J]. Ecological Research, 2017, 32(1): 61-70.

- [37] TEAM R C. The R Piject for Statistical Computing [EB/OL]. (2024-06-14) [2024-09-15]. <https://www.r-project.org/>.
- [38] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifer Plugin [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 90.
- [39] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Author Correction: Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1091.
- [40] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [41] WU Y N, LIN L, XIAO Y C, et al. Effects of Temperature Acclimation on Body Mass and Energy Budget in the Chinese Bulbul *Pycnonotus Sinensis* [J]. *Zoological Research*, 2014, 35(1): 33-41.
- [42] ATKINSON D. Temperature and Organism Size-A Biological Law for Ectotherms? [J]. *Advances in Ecological Research*, 1994, 25: 1-58.
- [43] DUNLAP D G. Influence of Temperature and Duration of Acclimation, Time of Day, Sex and Body Weight on Metabolic Rates in the Hylid Frog, *Acris Crepitans* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1969, 31(4): 555-570.
- [44] FEDER M E, BURGGREN W W. *Environmental Physiology of the Amphibians* [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1992.
- [45] LI H, WANG Z, MEI W B, et al. Temperature Acclimation Affects Thermal Preference and Tolerance in Three *Eremias* Lizards (Lacertidae) [J]. *Current Zoology*, 2009, 55(4): 258-265.
- [46] PENG J, CAO Z D, FU S J. The Effects of Constant and Diel-Fluctuating Temperature Acclimation on the Thermal Tolerance, Swimming Capacity, Specific Dynamic Action and Growth Performance of Juvenile Chinese Bream [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2014, 176: 32-40.
- [47] 庞旭, 付世建, 刘小红, 等. 中华倒刺鲃能量代谢和热耐受特征的体重效应 [J]. *生态学报*, 2020, 40(16): 5814-5821.
- [48] 余谔迪, 李玄, 肖微. 2019 年 6 月四川攀枝花一次持续高温天气的诊断分析 [J]. *高原山地气象研究*, 2022, 42(S1): 88-92.
- [49] DE OLIVEIRA ANDERSON R C, BOVO R P, ANDRADE D V. Seasonal Variation in the Thermal Biology of a Terrestrial Toad, *Rhinella Icterica* (Bufonidae), from the Brazilian Atlantic Forest [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2018, 74: 77-83.
- [50] KIR M, SUNAR M C, ALTINDAG B C. Thermal Tolerance and Preferred Temperature Range of Juvenile Meagre Acclimated to Four Temperatures [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 65: 125-129.
- [51] HAGGERTY J. Thermal Tolerance of the Common Coqui Frog (*Eleutherodactylus coqui*) in East Hawaii Along an Elevation Gradient [D]. Hawaii: University of Hawaii at Hilo, 2016.
- [52] CLAUSSEN D L. Thermal Acclimation in Ambystomatid Salamanders [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1977, 58(4): 333-340.
- [53] 陆洪良, 耿军, 徐卫, 等. 东方蝾螈幼体热耐受性和游泳表现的热驯化响应 [J]. *生态学报*, 2017, 37(5): 1603-1610.
- [54] 夏继刚, 黄艳, 付世建, 等. 斑马鱼热耐受性对温度驯化的响应及其性别差异 [J]. *生态学杂志*, 2019, 38(8): 2477-2481.
- [55] FLOYD R B. Ontogenetic Change in the Temperature Tolerance of Larval *Bufo Marinus* (Anura: Bufonidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1983, 75(2): 267-271.
- [56] DIAZ HERRERA F, SIERRA URIBE E, FERNANDO BÜCKLE RAMIREZ L, et al. Critical Thermal Maxima and Minima of *Macrobrachium Rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae) [J]. *Journal of Thermal Biology*, 1998, 23(6): 331-338.

381-385.

[57] KUMLU M, TÜRKMEN S, KUMLU M. Thermal Tolerance of *Litopenaeus Vannamei* (Crustacea: Penaeidae) Acclimated to Four Temperatures [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2010, 35(6): 305-308.

[58] ATKINSON D, SIBLY R M. Why Are Organisms Usually Bigger in Colder Environments? Making Sense of a Life History Puzzle [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 1997, 12(6): 235-239.

[59] HOPKINS W A. Amphibians as Models for Studying Environmental Change [J]. *ILAR Journal*, 2007, 48(3): 270-277.

[60] 任超璐. 温度对中国林蛙肠道菌群和脂质代谢以及骨骼发育的影响 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2022.

[61] 佟庆. 东北林蛙肠道菌群多样性及其影响因素研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.

[62] 周爽. 温度对两种林蛙肠道菌群、免疫能力和氧化应激的影响 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2023.

[63] SILBY M W, WINSTANLEY C, GODFREY S A C, et al. *Pseudomonas* Genomes: Diverse and Adaptable [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(4): 652-680.

[64] GOODFELLOW M, FIEDLER H P. A Guide to Successful Bioprospecting: Informed by Actinobacterial Systematics [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98(2): 119-142.

[65] THOMAS F, HEHEMANN J H, REBUFFET E, et al. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 93.

[66] MANN M B, PRICHULA J, DE CASTRO Í M S, et al. The Oral Bacterial Community in *Melanophryniscus admirabilis* (Admirable Red-Belly Toads): Implications for Conservation [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 220.

[67] COENYE T, VANDAMME P. Diversity and Significance of Burkholderia Species Occupying Diverse Ecological Niches [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(9): 719-729.

[68] HAO C, DE JONGE N, ZHU D, et al. Food Origin Influences Microbiota and Stable Isotope Enrichment Profiles of Cold-Adapted Collembola (*Desoria Ruseki*) [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1030429.

[69] HUANG S W, SHENG P, ZHANG H Y. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3): 2563-2577.

[70] WAN B W, CHEN G L, POON E S K, et al. Environmental Factors and Host Sex Influence the Skin Microbiota Structure of Hong Kong Newt (*Paramesotriton hongkongensis*) in a Coldspot of Chytridiomycosis in Subtropical East Asia [J]. *Integrative Zoology*, 2025, 20(2): 236-255.

[71] WOO P C, LEUNG P K, LEUNG K W, et al. Identification by 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing of an Enterobacteriaceae Species from a Bone Marrow Transplant Recipient [J]. *Molecular Pathology*, 2000, 53(4): 211-215.

[72] WALKE J B, BELDEN L K. Harnessing the Microbiome to Prevent Fungal Infections: Lessons from Amphibians [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(9): e1005796.

[73] TONG Q, CUI L Y, HU Z F, et al. Environmental and Host Factors Shaping the Gut Microbiota Diversity of Brown Frog *Rana Dybowskii* [J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 741: 140142.

[74] KUENEMAN J G, PARFREY L W, WOODHAMS D C, et al. The Amphibian Skin-Associated Microbiome across Species, Space and Life History Stages [J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(6): 1238-1250.