

同源湖羊在不同生长环境条件下生长性能和瘤胃内容物微生物组成的差异

陈凤梅¹ 程光民^{1*} 王 萍¹ 王云洲¹ 张万明² 胡士林^{1**} 徐相亭^{1**} 牛钟相³

(1. 山东畜牧兽医职业学院潍坊市反刍动物疾病防控工程中心, 潍坊 261061; 2. 河北高原现代生态畜牧业科技试验示范园, 海北 810299; 3. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 本试验旨在探讨不同生长环境对同源湖羊生长性能、瘤胃内容物微生物组成及生物信息的影响。选择遗传背景相似、同胎次的 1 岁左右的湖羊 90 只(公:母=1:8), 其中 45 只运输至青海省海晏某肉羊繁育基地饲养繁育, 另外 45 只留在山东高密某牧业有限公司饲养繁育。当年配种, 次年产羔。2 个地方所产的羔羊均 75 日龄断奶, 标记, 作为备选试验对象。试验分为 2 组, 山东组(sdlw 组)和青海组(qlw 组)。每组按照体重相近的原则挑选 90 日龄健康湖羊 40 只, 随机均分至 4 个饲养栏中(公母混养), 开始常规饲养试验。预试期 10 d, 正试期 150 d。试验结束后每组随机选取 4 只公羊剖杀并采集瘤胃液, 应用 16s RNA 技术分析细菌菌群差异及 Tax4Fun 功能预测。结果表明: 1) 在饲料营养物质基础相近的情况下, 青海组和山东组平均日增重差异显著($P<0.05$), 料重比差异显著($P<0.05$); 饲养在山东和青海的湖羊瘤胃内容物菌群丰富度无显著差异($P>0.05$)。2) 基于 Unweighted Unifrac 距离主成分分析(PCoA)发现, 山东组和青海组组内物种相似性较大, 组间物种多样性方面存在较大差异。3) 物种分析发现, 2 组在门水平上, 优势菌门有拟杆菌门、厚壁菌门、绿弯菌门, 在属水平上, 优势菌属为未鉴定普雷沃氏菌科、未鉴定瘤胃菌科、拟杆菌属; 优势菌种为普雷沃菌、瘤胃杆菌、栖瘤胃普雷沃菌。在门水平上, 山东组绿弯菌门相对丰度显著高于青海组($P<0.05$), 在属水平上, 青海组未鉴定普雷沃氏菌科相对丰度显著高于山东组($P<0.05$); 而未鉴定瘤胃菌科相对丰度显著低于山东组($P<0.05$)。4) 通过 LEfSe 分析发现, 青海组中起重要作用的为普雷沃菌属、普雷沃氏菌科, 而山东组中起重要作用的为瘤胃菌科、g_Flexilinea、厌氧绳菌纲、c_Anaerolineales、绿弯菌纲、厌氧绳菌科。5) 通过对生物代谢通路一级功能层分析发现, 山东组在环境信息处理、细胞代谢和新陈代谢等代谢通路的基因表达丰度较青海组高; 对二级功能层分析发现, 山东组在转录、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、脂质代谢、细胞群落原核生物、新陈代谢、细胞过程和信号传导等方面基因表达丰度明显高于青海组。综上所述, 在饲料营养物质基础相近的情况下, 青海组和山东组湖羊平均日增重差异显著, 料重比差异显著; 不同生长环境可以显著改变同源湖羊瘤胃内容物微生物组成与多样性; 饲喂在山东的湖羊在转录、营养物质代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、脂质代谢、新陈代谢、膜运输、细胞群落原核生物、细胞过程和信号传导等方面基因丰度的表达优于饲喂在青海的湖羊。

关键词: 湖羊生长环境; 生长性能; 同源不同地湖羊; 瘤胃微生物区系

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)09-4230-12

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系羊产业创新团队(SDAIT-10-05); 潍坊市反刍动物疾病防控工程中心项目

作者简介: 陈凤梅(1979—), 女, 山东泰安人, 讲师, 硕士, 研究方向为微生态制剂及牛羊疫病防控。E-mail: 13563600485@163.com

* 同等贡献作者

** 通信作者: 胡士林, 教授, E-mail: sdmxhsl@163.com; 徐相亭, 教授, E-mail: sdmxyxxt@126.com

植物纤维性饲料可被瘤胃微生物降解成可利用营养物质,提供给宿主大约70%的能量,转化成畜产品^[1]。瘤胃微生物结构的变化与动物生产效率密切相关^[2-3]。董春晓等^[4]研究粗饲料来源对育肥湖羊瘤胃微生物组成的影响,发现玉米芯有利于纤维分解菌的增殖,适于作为湖羊粗饲料来源。Zhao等^[5]研究表明,随着奶牛饲料中粗饲料的变化,瘤胃微生物结构会发生变化。李与琦等^[6]研究发现,饲喂50%微贮棉秆在提高日增重的同时对湖羊瘤胃微生物菌群结构与功能影响较小。马万浩等^[7]研究发现,瘤胃微生物多样性受饲料和断奶日龄的影响,早期断奶可加速瘤胃微生物区系的建立。前人对湖羊的研究主要集中在饲料类型、断奶日龄及生理状态等对动物瘤胃微生物群落结构方面的影响,而生长环境对湖羊瘤胃微生物组成影响的研究较少。王慧慧等^[8]通过对来自亚洲、非洲和欧洲等国家的1 002例健康人群肠道菌群数据分析表明,3岁以上亚洲、非洲和欧洲等地区健康人群肠道菌群则展示出了地域环境性特征。俞英豪^[9]对不同生境下大青叶蝉肠道细菌多样性进行研究,结果表明不同季节和不同地理位置是影响大青叶蝉肠道微生态的重要因素。柴英辉等^[10]研究揭示了仿刺参肠道微生物在不同地域环境之间存在明显差异。湖羊是世界上唯一的多胎白色羔皮羊品种,主要分布于我国浙江、江苏太湖流域。由于其适应性强、耐粗饲、耐寒暑、抗病力强,近年来山东、河南、新疆、西藏等地区引进湖羊的数量与日俱增。本研究旨在探讨在饲料营养物质基础相近的情况下,不同生长环境对湖羊生长性能及瘤胃内容物微生物组成与功能的影响,为湖羊跨地区引种提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验环境

1.1.1 山东高密

高密位于山东半岛中部,胶莱平原腹地,平均海拔19.3 m,地理位置为北纬36°8′44″至36°41′20″、东经119°26′16″至120°0′38″。境域属季风性暖温带大陆性半湿润气候,年降水量在880 mm左右,气候宜人,冬冷夏热,四季分明。年日照时数2 528.9 h左右。

1.1.2 青海海晏

海晏位于青海省东北部,傍依祁连山脉,平均

海拔3 000 m以上,地理位置为北纬36°44′至37°39′、东经100°23′至101°20′。境域属高原亚干旱气候,年降水量在400 mm左右,春季干旱多风,夏季凉爽,秋季短暂,冬季漫长。海晏年平均气温1.5℃左右,年日照时数2 980 h左右。

1.2 试验动物及设计

选择遗传相似、同胎次的1岁左右的湖羊90只,其中45只运输至青海省海晏某肉羊繁育基地饲养繁育,另一部分留在山东高密某牧业有限公司饲养繁育,公母比例均为1:8。当年配种,次年产羔。2个地方所产的羔羊均75日龄断奶,标记作为备选试验对象。

试验分为2组:山东组(sdlw组)和青海组(qhlw组),每组按照体重相近的原则挑选90日龄健康湖羊40只,随机均分至4个饲养栏(公母混养)中,开始常规饲养试验。预试期10 d,正试期150 d。

1.3 试验饲料

试验羊均以地方饲料原料为主制作全混合日粮。饲料配方参照《肉羊饲养标准》(NY/T 816—2004),按照肉羊体重25 kg、日增重0.25 kg/d营养需要量进行配制。饲料组成及营养水平见表1。

表1 饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (DM basis) %

项目 Items	山东组 sdlw group	青海组 qhlw group
原料 Ingredients		
玉米 Corn	38.0	40.5
豆粕 Soybean meal	10.0	6.0
棉籽粕 Cottonseed meal	8.0	
菜籽饼 Rapeseed cake		12.0
花生秧 Peanut seedling	18.0	
全株青贮玉米 Whole silage corn	18.0	
蒜皮 Running errands	4.0	
青稞秸秆 Highland barley		16.0
青贮燕麦 Silage oats		21.0
石粉 Limestone		0.5
磷酸氢钙 CaHPO ₄		0.5
食盐 NaCl	0.7	0.7
小苏打 NaHCO ₃	1.0	0.5
预混料 Premix ¹⁾	2.3	2.3
合计 Total	100.0	100.0

续表 1

项目 Items	山东组 sdlw group	青海组 qhlw group
营养水平 Nutrient levels ²⁾		
消化能 DE/(MJ/kg)	13.58	13.34
粗蛋白质 CP	16.82	17.24
粗灰分 Ash	6.28	6.81
中性洗涤纤维 NDF	41.60	46.07
酸性洗涤纤维 ADF	28.37	30.30
钙 Ca	0.66	0.71
磷 P	0.52	0.47

1) 青海组预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet for qhlw group: VA 11 000 IU, VD₃ 2 000 IU, VE 35 IU, Fe 70 mg, Cu 13 mg, Zn 65 mg, Mn 60 mg, Se 0.35 mg, I 1.2 mg, Co 0.4 mg。山东组预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet for sdlw group: VA 12 000 IU, VD₃ 2 000 IU, VE 30 IU, Fe 65 mg, Cu 12 mg, Zn 60 mg, Mn 56 mg, Se 0.35 mg, I 1.1 mg, Co 0.3 mg。

2) 消化能为计算值,其他为实测值。The DE was a calculated value, while the others was measured values.

1.4 饲养管理

试验前对圈舍进行清扫、消毒,对羊只实行驱虫、防疫、打耳号。日饲喂 2 次(08:30、18:30),自由采食、饮水。其他管理均参照所属繁育基地执行。

1.5 采食量及体重测定

每天饲喂前,记录前 1 天剩料量和加料量,每天收集 1 次剩料,计算干物质含量,用于计算整个试验期各组羊干物质采食量。试验羊于试验开始当天测定空腹体重,作为初始体重,正试 150 d 后测定终末体重,计算每只羊平均日增重。

1.6 样品采集

饲养试验结束后第 2 天,每组随机选取 4 只公羊,颈静脉放血,立即剖开腹腔,结扎胃贲门与幽门,取出羊瘤胃,于左前腹盲囊处采集约 50 mL 瘤胃内容物,4 层纱布过滤于离心管内,冰封迅速转入 -80 °C 冰箱保存,以备送检。

1.7 样本送检

将样品送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司,采用 Illumina Miseq 平台进行测序。

1.8 生物信息分析

1.8.1 测序数据处理

先用 Cutadapt 对 reads 进行低质量部分剪切,再从所得 reads 中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列初步质控得到原始数据(Raw reads),经过以上处理后得到的 reads 需要进行去除嵌合体序列的处理,通过将 reads 序列与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列,去除其中嵌合体序列,得到最终有效数据(clean reads)。

1.8.2 操作分类单元(OTUs)聚类 and 物种注释

利用 Uparse 软件对全部 clean reads 进行聚类,以 97% 一致性(identity)将序列聚类为 OTUs,选取 OTUs 代表性序列,筛选 OTUs 中出现高频序列作为 OTUs 代表序列。对 OTUs 序列进行物种注释,用 SILVA132 的 SSUrRNA 数据库与 Mothur 方法进行物种注释分析(设定阈值为 0.8~1.0),获得分类学信息并分别在各分类水平(门、纲、目、科、属、种)统计各样本的群落组成。使用 MUSCLE(Version 3.8.31)软件进行快速多序列比对,得到所有 OTUs 序列系统发生关系,以样品中数据量最少的 OTUs 为标准进行均一化处理,后续 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性分析均基于均一化处理数据。

1.8.3 样本复杂度分析

使用 Qiime 软件(Version 1.9.1)计算可见物种指数、Simpson 指数、Chao1 指数、Shannon 指数、ACE 指数、D_{whole}_tree 指数、覆盖度,使用 R 软件(Version 2.15.3)绘制 Rank abundance 曲线、稀释曲线、物种累积曲线,并使用 Tukey 检验和 Wilcox 检验进行 Alpha 多样性指数组间差异分析。

使用 Qiime 软件(Version 1.9.1)计算 Unifrac 距离,使用非加权组平均法(UPGMA)绘制聚类树。使用 R 软件(Version 2.15.3)绘制主成分分析(PCA)、主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)图。使用 R 软件,分别进行有参数检验和非参数检验,用 Tukey 检验和 Wilcox 检验进行 Beta 多样性指数组间差异分析。

使用 LEfSe 软件进行 LEfSe 分析,默认设置线性判别分析分数(LDA score)的筛选值为 4。

1.8.4 Tax4Fun 功能注释

提取 KEGG 数据库原核生物全基因组 16S rRNA 基因序列并利用 BLASTN 算法将其比对到 SILVA SSU Ref NR 数据库(BLAST bitscore >

1 500) 建立相关矩阵,通过超快速蛋白质序列分类工具 (UProC) 和 DNA 对准剂进行蛋白质比对 (PAUDA) 2 种方法注释 KEGG 数据库原核生物全基因组功能信息,并将信息对应到 SILVA 数据库中,实现 SILVA 数据库功能注释。测序样品以 SILVA 数据库序列为参考序列聚类出 OTUs,进而获取功能注释信息。

1.9 数据统计

使用 Excel 2010 进行试验数据整理,采用 SAS 9.1.3 软件的 ANOVA 程序进行方差分析,并

以 Duncan 氏法进行多重比较检验, $P>0.05$ 表示差异不显著, $P<0.05$ 表示差异显著,试验结果用“平均值 \pm 标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 不同生长环境对湖羊生长性能的影响

由表 2 可知,在经过 5 个月的饲养试验后,尽管试验羊遗传背景、日龄、饲粮营养物质基础相近,但青海组和山东组平均日增重差异显著($P<0.05$),料重比差异显著($P<0.05$)。

表 2 不同生长环境对湖羊生长性能的影响

Table 2 Effects of different growing environments on growth performance of *Hu* sheep

项目 Items	山东组 sdlw group	青海组 qhlw group	P 值 P-value
初始体重 Initial weight/kg	28.35 \pm 1.02	15.04 \pm 1.35	0.034
终末体重 Final weight/kg	51.75 \pm 3.56	33.27 \pm 1.27	0.029
平均日增重 Average daily gain/g	260.00 \pm 3.27 ^a	201.00 \pm 2.09 ^b	0.038
干物质采食量 DMI/(g/d)	1 848.23 \pm 4.01	1 796.18 \pm 6.18	0.047
料重比 F/G	7.11 \pm 0.08 ^a	8.94 \pm 0.06 ^b	0.027

同行数据肩标无字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

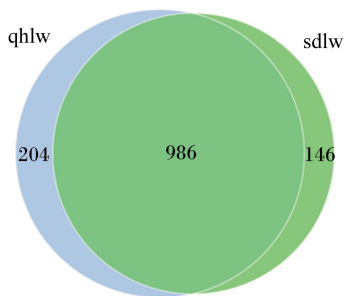
In the same row, values with no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2 不同生长环境对湖羊瘤胃内容物微生物组成的影响

2.2.1 不同生长环境对湖羊瘤胃内容物细菌菌落丰富度和多样性的影响

2.2.1.1 湖羊瘤胃内容物细菌菌群物种注释

Venn 图显示 2 组之间共有 986 个 OTUs,青海组特有 204 个 OTUs,山东组特有 146 个 OTUs(图 1),说明不同生长环境下的湖羊瘤胃内容物微生物组成有所差异。



qhlw: 青海组 *Qinghai* group; sdlw: 山东组 *Shandong* group。下图同 the same as below。

图 1 维恩图

Fig.1 Venn graph

2.2.1.2 湖羊瘤胃内容物细菌菌群 Alpha 多样性分析

由表 3 可知,湖羊饲养在青海和山东瘤胃内容物菌群的可见物种指数及 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数及 Simpson 指数差异均不显著($P>0.05$),说明在饲粮营养物质基础相近的情况下,不同生长环境下的湖羊微生物丰富度变化不显著。覆盖度反映样品的测序深度,6 个样品覆盖度均在 0.99 以上,表明本次测序结果可以反映样本的真实情况。

2.2.1.3 湖羊瘤胃内容物细菌菌群 Beta 多样性分析

Beta 多样性是指不同环境群落之间的物种差异性,用来比较样品在组间物种多样性方面存在的差异。Beta 多样性与 Alpha 多样性一起构成了总体多样性或一定环境群落的生物异质性。PCoA 展示各个样品间的差异大小,样品距离越近,表示样品的物种组成越相近。基于 Unweighted Unifrac 距离 PCoA, PC2 贡献率 24.95%, PC1 贡献率 25.59%;以 Weighted Unifrac 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析,样品越靠近,枝长越短,说明 2 个样本

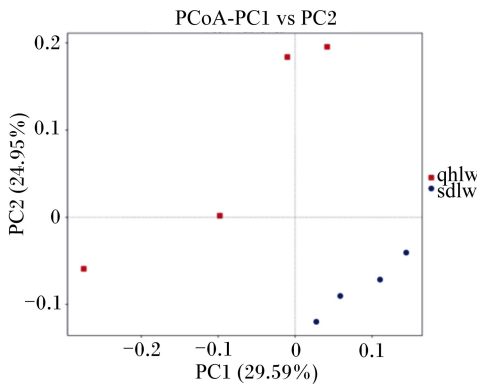
的物种组成越相似,并将聚类结果在门水平上对各样本的物种相对丰度整合展示。由图 2、图 3 分析得出,山东组样品聚类较好,青海组相对分散,说明生长在青海的湖羊瘤胃内容物微生物物种组成差异较大,生活在山东的湖羊瘤胃内容物微生物

物种差异较小。Anosim 分析是一种非参数检验,用来检验组间差异是否显著大于组内差异,从而判断分组是否有意义。由图 4 可知,山东组和青海组组间群落结构差异显著 ($R = 0.427$, $P = 0.027$)。

表 3 湖羊瘤胃内容物细菌菌群 Alpha 多样性分析

Table 3 Bacterial Alpha diversity analysis of rumen contents of *Hu* sheep

项目 Items	青海组 qhlw group	山东组 sdlw group	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
可见物种指数 Observed_species index	777.000±113.393	814.000±15.286	0.536
Chao1 指数 Chao1 index	825.395±108.959	866.755±9.508	3.046
ACE 指数 ACE index	827.266±107.270	865.282±11.621	0.507
Shannon 指数 Shannon index	6.354±1.506	6.654±0.402	0.713
Simpson 指数 Simpson index	0.924±0.106	0.969±0.016	1.000
覆盖度 Coverage	0.998±0.000	0.998±0.000	0.065



PC1 表示一个主成分,PC2 表示另一个主成分,百分比表示主成分对样本差异的贡献值。

PC1 represents one principal component, PC2 represents another principal component, and the percentage represents the contribution of the principal component to the sample difference.

图 2 基于非加权距离 PCoA 分析

Fig.2 PCoA analysis based on unweighted distance

2.2.2 生长环境对湖羊瘤胃内容物细菌菌群组成的影响

由图 5-A 可知,在门水平上,2 组优势菌门主要为拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*),山东组绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 相对丰度显著高于青海组 ($P < 0.05$);在属水平上,优势菌属包括未鉴定普雷沃氏菌科 (*unidentified_Prevotellaceae*)、未鉴定瘤胃菌科 (*unidentified_Ruminococcaceae*)、未鉴定拟杆菌属 (*unidentified_Bacteroides*)。青海组未鉴定普雷沃氏菌科相对丰度显著高于山

东组 ($P < 0.05$),而未鉴定瘤胃菌科相对丰度显著低于山东组 ($P < 0.05$) (图 5-B)。这表明饲养在山东和青海的湖羊瘤胃内容物微生物结构存在差异。

2.3 差异物种分析

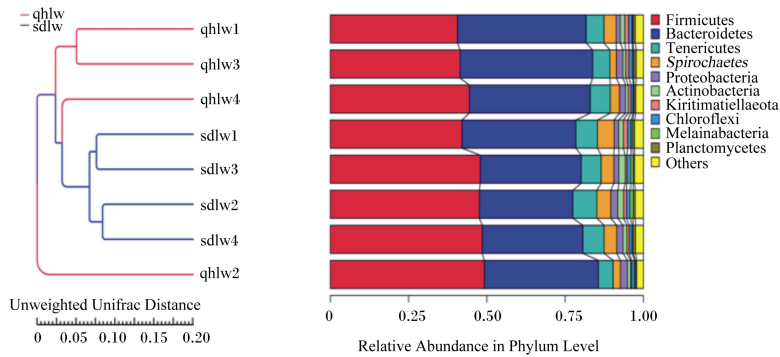
利用 Kruskal-Wals 秩和检验检测所有的特征物种,通过检测不同组间的物种丰度差异,获得显著性差异物种;再利用 Wilcoxon 秩和检验检测上一步获得的显著性差异物种的所有亚种是否都趋同于同一分类级别,然后通过线性判别分析 (LDA) 实现降维,从而评估差异物种的影响大小,即得到 LDA score,最后绘制差异物种的 LDA 值分布柱状图。通过对青海组和山东组 LEfSe 分析, LDA score > 4 的 biomarker 共有 8 个,由图 6 可知,普雷沃菌属 (*Prevotella*_sp_DJF_CP65)、普雷沃氏菌科 (*f_Prevotellaceae*) 在青海组中起着重要作用,而瘤胃球菌科 (*f_Ruminococcaceae*)、克柔丝菌 (*g_Flexilinea*)、厌氧绳菌纲 (*c_Anaerolineae*)、*o_Anaerolineales*、绿弯菌纲 (*p_Chloroflexi*)、厌氧绳菌科 (*f_Anaerolineaceae*) 在山东组中起着重要作用。数据分析表明,不同的生长环境改变了瘤胃内容物微生物组成。

2.4 不同生长环境对湖羊瘤胃内容物微生物组成的生物代谢通路的影响

本试验共获得 7 类生物代谢通路功能分析一级功能层 (图 7-A): 人类疾病、新陈代谢、遗传信息处理、生物体系统、未鉴定功能、细胞过程和环境信息处理。山东组在环境信息处理、细胞代谢、

新陈代谢和未鉴定功能 4 个生物代谢通路的基因表达丰度较青海组高,青海组在遗传信息处理、人类疾病、有机系统方面基因表达丰度高。进一步对预测基因二级功能层进行分析,发现其由遗传信息处理、感染性疾病、氨基酸代谢等 35 个子功

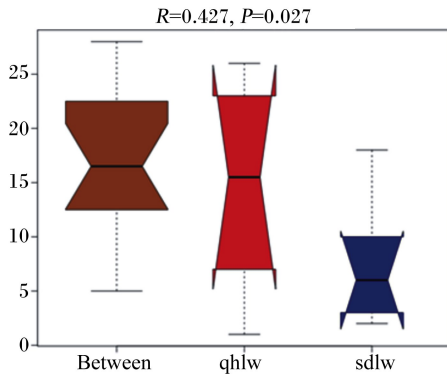
能组成(图 7-B)。对其基因表达丰度进行分析,发现山东组在转录、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、脂质代谢、原核生物细胞社区、新陈代谢、细胞过程和信号、细胞活性生物降解和代谢等方面生物代谢通路的基因表达丰度明显高于青海组。



Unweighted Unifrac Distance:非加权距离;Relative Abundance in Phylum Level:门水平相对丰度;Firmicutes:厚壁菌门;Bacteroidetes:拟杆菌门 Tenericutes:无壁菌门;Spirochaetes:螺旋体属;Proteobacteria 变形菌门;Actinobacteria:放线菌门;Chloroflexi:绿弯菌门;Melainabacteria:黑水仙菌菌门;Planctomycetes:浮霉菌门;Others:其他。

图 3 基于 UPGMA 聚类树

Fig.3 Cluster tree based on UPGMA



Between:组间; R 、 P : R 值、 P 值。 R -value 介于 $(-1, 1)$ 之间, R 值大于 0,说明组间差异显著。 R 值小于 0,说明组内差异大于组间差异,统计分析的可信度用 P 值表示, $P < 0.05$ 表示统计具有显著性。

Between: between groups; R , P : R -value, P -value. R -value is between $(-1, 1)$, and R -value is greater than 0, indicating significant differences between groups. R -value is less than 0, indicating that the difference within the group is greater than the difference between the groups. The reliability of statistical analysis is represented by P -value, and $P < 0.05$ means that the statistics are significant.

图 4 组间 Anosim 分析

Fig.4 Anosim analysis between groups

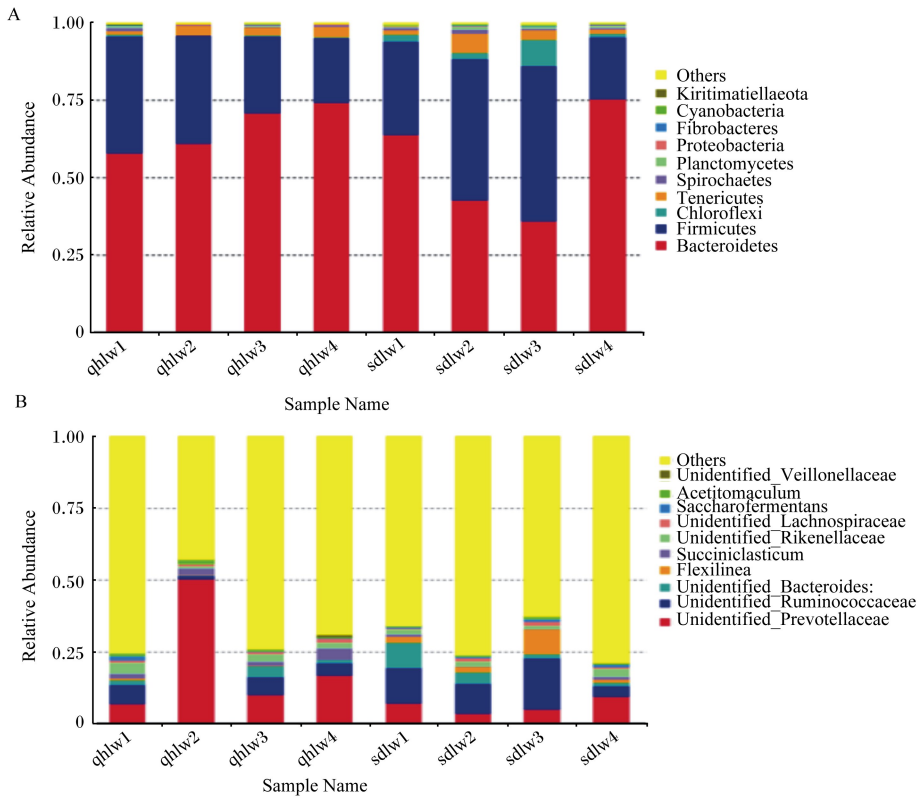
3 讨论

3.1 不同生长环境对湖羊生长性能的影响

赵亚星等^[11]研究表明,粗饲料不同会导致动物采食量和消化率不同,其生长性能就会存在差异。本试验中尽管试验羊遗传背景、日龄、饲粮营养物质基础相近,但青海地区海拔高,空气含氧量低,运输到青海的湖羊生理负荷重,羔羊初生重明显降低,同时饲粮组成方面青海组与山东组存在较大差异,生长环境和饲粮的差异导致青海组平均日增重和料重比显著低于山东组,影响了湖羊的生长性能。

3.2 不同生长环境对湖羊瘤胃内容物微生物组成的影响

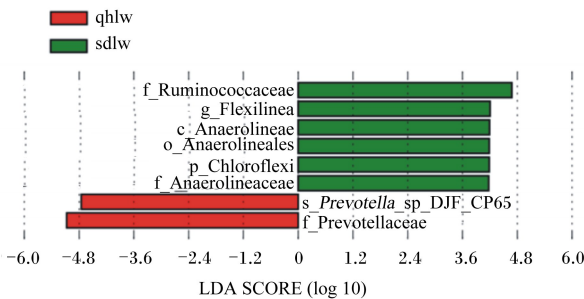
研究表明,湖羊 20 日龄时在其瘤胃内就可发现拟杆菌门、厚壁菌门^[12]。李与琦等^[6]也发现,拟杆菌门和厚壁菌门是组成湖羊瘤胃门水平微生物的主要类群。Henderson 等^[13]对来自不同国家和地区 742 头反刍动物瘤胃微生物区系研究发现,虽然地理位置不同,但核心菌群仍然是反刍动物所共有。本研究结果与前人结果相一致,尽管青海组和山东组湖羊生长环境不同,但其瘤胃内容物核心菌群未发生变化。



A: 门水平 phylum level; B: 属水平 genus level; Relative Abundance: 相对丰度; Sample Name: 样品名称; Others: 其他; Cyanobacteria: 蓝藻门; Fibrobacteres: 纤维杆菌门; Proteobacteria: 变形菌门; Planctomycetes: 浮霉菌门; Spirochaetes: 螺旋体门; Tenericutes: 无壁菌门; Chloroflexi: 绿弯菌门; Firmicutes: 厚壁菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Unidentified_Veillonellaceae: 未鉴定韦荣球菌科; Unidentified_Lachnospiraceae: 未鉴定毛螺菌科; Unidentified_Rikenellaceae: 未鉴定理研菌科; Succiniclasticum: 琥珀酸菌; Unidentified_Bacteroides: 未鉴定拟杆菌属; Unidentified_Ruminococcaceae: 未鉴定瘤胃菌科; Unidentified_Prevotellaceae: 未鉴定普雷沃氏菌科。

图 5 不同组的微生物结构

Fig.5 Microbial structure in different groups

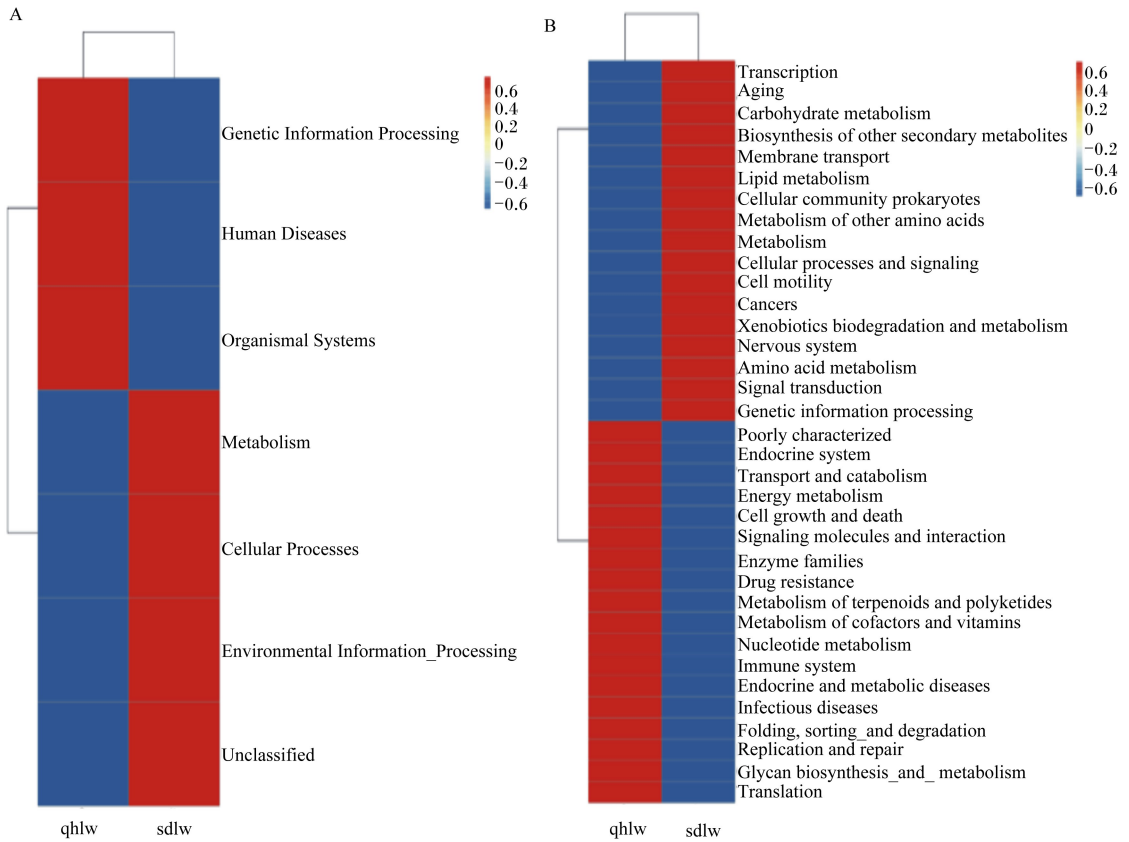


f_Ruminococcaceae: 瘤胃球菌科; g_Flexilinea: 克柔丝菌; c_Anaerolineae: 厌氧绳菌纲; p_Chloroflexi: 绿弯菌纲; f_Anaerolineaceae: 厌氧绳菌科; *Prevotella*_sp_DJF_CP65: 普雷沃菌属; f_Prevotellaceae: 普雷沃氏菌科。

图 6 LEfSe 分析

Fig.6 LEfSe analysis

本研究中, 山东组湖羊瘤胃内容物绿弯菌门相对丰度显著高于青海组。绿弯菌门是一类通过光合作用产生能量的细菌, 又称作绿非硫细菌, 尼丽^[14]研究表明, 绿弯菌门是严格的化能异养型细菌, 且具有多种代谢途径; 王金凤^[15]发现, 不同植被演替、水位土壤微生物结构和多样性不同, 其中在不同植被和不同水位时期绿弯菌门和变形菌门所占比例均较高; 刘佳斌^[16]对土壤微生物群落研究发现, 放线菌门、绿弯菌门的相对丰度与含水量呈显著正相关。本研究中, 山东安丘年降水量在 380 mm 左右, 而青海海晏年降水量在 400 mm 左右, 估计土壤含水量的差异影响到当地土壤微生物群落中绿弯菌门的含量, 进而影响到当地水分与植物中绿弯菌门的含量, 最终山东组绿弯菌门相对丰度高于青海组。



A:一级功能层 primary functional layer;B:二级功能层 secondary functional layer;Genetic Information Processing:遗传信息处理;Human Diseases:人类疾病;Organismal Systems:有机系统;Metabolism:新陈代谢;Cellular Processes:细胞代谢;Environmental Information Processing:环境信息处理;Unclassified:未分类;Transcription:转录;Aging:老化;Carbohydrate metabolism:碳水化合物代谢;Biosynthesis of other secondary metabolites:其他次生代谢物的生物合成;Membrane transport:膜运输;Lipid metabolism:脂质代谢;Cellular community prokaryotes:细胞群落原核生物;Metabolism of other amino acids:其他氨基酸的代谢;Metabolism:新陈代谢;Cellular processes and signaling:细胞过程和信号传导;Cell motility:细胞运动;Cancers:癌症;Xenobiotics biodegradation and metabolism:异生物素的生物降解和代谢;Nervous system:神经系统;Amino acid metabolism:氨基酸代谢;Signal transduction:信号转导;Genetic information processing:遗传信息处理;Endocrine system:内分泌系统;Transport and catabolism:运输和分解代谢;Energy metabolism:能量代谢;Cell growth and death:细胞生长与死亡;Signaling molecules and interaction:信号分子与相互作用;Enzyme families:酶家族;Drug resistance:耐药性;Metabolism of terpenoids and polyketides:萜类化合物和聚酮类化合物的代谢;Metabolism of cofactors and vitamins:辅助因子和维生素代谢;Nucleotide metabolism:核苷酸代谢;Immune system:免疫系统;Endocrine and metabolic diseases:内分泌及代谢性疾病;Infectious diseases:传染病;Folding, sorting and degradation:折叠、分类和降解;Replication and repair:复制和修复;Glycan biosynthesis and metabolism:多糖合成与代谢;Translation:翻译。

图7 Tax4Fun 功能注释聚类热图

Fig.7 Tax4Fun functional annotation cluster heat map

微生物可将粗饲料中纤维物质快速降解转化为营养物质,从而满足反刍动物的能量需求,而纤维素的降解主要受到纤维素降解菌的影响^[17-19]。Wongwilaiwalin等^[20]报道,降解纤维素的微生物由厚壁菌门和拟杆菌门下的菌属组成。拟杆菌门

是瘤胃中蛋白质和非纤维植物多糖的主要分解者^[21],该菌门中的普雷沃氏菌属在反刍动物瘤胃中含量最高^[22]。Thoetkiattikul等^[23]研究了3种不同纤维、淀粉的饲料对奶牛瘤胃菌群多样性的影响,结果发现高淀粉饲料组具有多聚糖降解功能的普雷沃氏菌属和黄杆菌属的含量最高。普雷沃

氏菌在瘤胃中可降解并利用淀粉和植物细胞壁多糖,如木聚糖和果胶,某些栖瘤胃普雷沃氏菌株具有很强的降解燕麦木聚寡糖的能力^[24]。本研究中,青海组未鉴定普雷沃氏菌科和普雷沃氏菌属相对丰度显著高于山东组,推测与青海饲料中含有21%的燕麦有关,这说明瘤胃内容物菌群结构会随着饲料的改变而改变。

厚壁菌门中占有较大比例的丁酸弧菌属、醋酸弧菌属和瘤胃球菌属主要分解纤维^[25],瘤胃球菌在胃肠道中降解纤维素^[26]。Hoetkiattikul等^[23]研究发现,饲喂高纤维饲料的动物胃肠道中毛螺旋菌(*Lachnospiraceae*)、纤维杆菌科(*Fibrobacteraceae*)及瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)等纤维降解菌的相对丰度最高;另有研究表明,在同一作物中,生长地域的海拔高度、气候条件、土壤酸碱性和含氧量等因素都会在不同程度上影响作物秸秆中粗纤维素含量^[27]。本研究中,山东组瘤胃球菌科相对丰度显著高于青海组,可能与山东组饲料中的粗纤维含量有关。

高风^[28]研究指出,不同自然环境下的土壤微生物菌群结构及多样性差异显著,高原放牧区奶牛肠道菌群与土壤微生物群落结构间某些菌属存在显著相关性。推测本研究中瘤胃菌群结构的差异和青海地区海拔高、空气含氧量低、昼夜温差大、积温少以及饲料差异等因素有关。因此,不同地区土壤微生物结构不同,影响饲料菌群组成,进而影响到瘤胃内容物菌群结构,这也从瘤胃微生物区系的角度揭示了动物对环境的适应机制。

3.3 不同生长环境对湖羊瘤胃内容物微生物生物代谢通路的影响

通过对生物代谢通路一级功能层分析发现,山东组在环境信息处理、细胞代谢、新陈代谢和未鉴定功能4个生物代谢通路的基因表达丰度较青海组高,青海组在遗传信息处理、人类疾病、有机系统方面基因表达丰度高;对二级功能层分析发现,山东组在转录、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、脂质代谢、原核生物细胞社区、新陈代谢、细胞过程和信号、细胞活性生物降解和代谢等方面生物代谢通路的基因表达丰度明显高于青海组。

青海海晏属于高原亚干旱气候,春季干旱多风,夏季凉爽,秋季短暂,冬季漫长,空气稀薄,具有气温低、昼夜温差大、降雨少而集中、日照长、太

阳辐射强等,而山东高密以暖温带大陆性半湿润气候气候为主。湖羊运输到青海后,先经过了一段时间的适应。由于地势海拔高,空气含氧量低,湖羊到青海后生理代谢均需经过一定的调整。两地不同的水源、气溶胶中的微生物含量、气温、空气含氧量、日照时间等,均影响着生物代谢通路基因丰度的表达。从功能预测上来讲,饲喂在山东的湖羊在转录、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、脂质代谢、原核生物细胞社区、新陈代谢、细胞过程和信号、细胞活性生物降解和代谢等方面生物代谢通路的基因丰度表达明显优于饲喂在青海的湖羊。是否可以通过添加适宜的微生物制剂调控其瘤胃代谢,改善其瘤胃功能,进而促进湖羊较好的适应新环境尚待进一步研究。

4 结 论

① 在遗传背景、日龄、饲料营养物质基础相近情况下,青海组和山东组湖羊平均日增重差异显著,料重比差异显著。

② 不同生长环境可以显著改变同源湖羊瘤胃微生物组成与多样性。

③ 山东组湖羊在转录、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输、脂质代谢、细胞群落原核生物、新陈代谢、细胞过程和信号、细胞活性生物降解和代谢等方面生物代谢通路的基因丰度表达明显优于青海组湖羊。

参考文献:

- [1] PUNIYA A K, SINGH R, KAMRA D N. Rumen microbiology: from evolution to revolution [M]. New Delhi: Springer, 2015.
- [2] JEWELL K A, MCCORMICK C A, ODT C L, et al. Ruminant bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4697-4710.
- [3] BEN SHABAT S K, SASSON G, DORON-FAIGENBOIM A, et al. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(12): 2958-2972.
- [4] 董春晓, 吕佳颖, 牛晓麟, 等. 粗饲料来源对育肥湖羊瘤胃微生物区系及肌肉脂肪酸组成的影响 [J]. *草业科学*, 2019, 36(11): 2926-2936.

- [5] ZHAO S, ZHAO J, BU D, et al. Metabolomics analysis reveals large effect of roughage types on rumen microbial metabolic profile in dairy cows [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59 (1) : 79–85.
- [6] 李与琦, 阳建华, 张涛, 等. 日粮中添加不同比例微贮棉秆对湖羊瘤胃微生物区系的影响 [J/OL]. *微生物学报*, 2020: 1–14. (2019–12–27) [2020–03–01]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20190452>.
- [7] 马万浩, 张宁, 李飞, 等. 断奶日龄对湖羊羔羊瘤胃内微生物多样性的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30 (8) : 3055–3062.
- [8] 王慧慧, 李寅虎, 邱创钊, 等. 1067 例不同年龄及地域人群肠道菌群特征 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31 (9) : 1000–1004.
- [9] 俞英豪. 不同生境下大青叶蝉肠道细菌多样性研究 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [10] 柴英辉, 高菲, 王金锋, 等. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 肠道菌群的地域性差异与共性研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50 (5) : 1127–1137.
- [11] 赵亚星, 张兴夫, 宋利文, 等. 全株玉米青贮对肉羊生长性能、屠宰性能和肉品质的影响 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32 (1) : 253–258.
- [12] 岳喜新. 蛋白水平及饲喂量对早期断奶羔羊生长性能及消化代谢的影响 [D]. 硕士学位论文. 阿拉尔: 塔里木大学, 2011.
- [13] HENDERSON G, COX F, GANESH S, et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19175.
- [14] 尼丽. 腾冲热泉环境细菌多样性研究及 *Tepidimonas* 和 *Chloroflexi* (TK17) 类群全基因组分析 [D]. 博士学位论文. 昆明: 云南大学, 2018.
- [15] 王金凤. 鄱阳湖湿地植被演替和水位对土壤有机碳、微生物多样性的影响 [D]. 硕士学位论文. 南昌: 江西师范大学, 2016.
- [16] 刘佳斌. 蚯蚓粪基质对番茄枯萎病的抑制作用研究 [D]. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [17] ASCHENBACH J R, PENNER G B, STUMPF F, et al. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH [J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89 (4) : 1092–1097.
- [18] 郭婷婷, 胡丹丹, 付子琳, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序分析技术研究甘露寡糖对奶牛瘤胃菌群结构的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30 (10) : 4048–4058.
- [19] WU S G, WANG G T, ANGERT E R, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (2) : e30440.
- [20] WONGWILAIWALIN S, LAOTHANACHAREON T, MHUANTONG W, et al. Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (20) : 8941–8954.
- [21] PITTA D W, PINCHAK W E, DOWS S, et al. Longitudinal shifts in bacterial diversity and fermentation pattern in the rumen of steers grazing wheat pasture [J]. *Anaerobe*, 2014, 30: 11–17.
- [22] MEYER M, STENZEL U, HOFREITER M. Parallel tagged sequencing on the 454 platform [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3 (2) : 267–278.
- [23] THOETKIATTIKUL H, MHUANTONG W, LAOTHANACHAREON T, et al. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing [J]. *Current Microbiology*, 2013, 67 (2) : 130–137.
- [24] 冯仰廉. 反刍动物营养学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 2–5.
- [25] 刘开朗, 王加启, 卜登攀. 2008—2009 年反刍动物营养研究进展 I. 瘤胃微生物多样性与功能 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37 (2) : 5–14.
- [26] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (2) : 121–131.
- [27] 宋萍, 蔡义民, 兰庆瑜, 等. 青海不同地区青稞秸秆中粗纤维含量的测定 [J]. *化学世界*, 2009, 50 (6) : 336–338.
- [28] 高凤. 奶牛肠道微生物群落结构与多样性研究 [D]. 硕士学位论文. 邯郸: 河北工程大学, 2017.

Differences of Growth Performance and Rumen Content Microbial Composition of Homologous *Hu* Sheep under Different Growing Environmental Conditions

CHEN Fengmei¹ CHENG Guangmin^{1*} WANG Ping¹ WANG Yunzhou¹ ZHANG Wanming²
 HU Shilin^{1**} XU Xiangting^{1**} NIU Zhongxiang³

(1. Weifang Ruminant Disease Prevention and Control Engineering Center, Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China; 2. Haibei Plateau Modern Ecological Animal Husbandry Science and Technology Experimental Demonstration Park, Haibei 810299, China; 3. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to investigate the effects of different growing environments on the growth performance, rumen content microbial composition and biological information of the homologous *Hu* sheep. A total of 90 *Hu* sheep (male:female=1:8) about 1-year-old with similar genetic background and the same birth order were selected and randomly divided into two groups. One group with 45 sheep were transported to a sheep rearing and breeding base in *Haiyan*, *Qinghai* province for breeding. Another group with 45 sheep were transported to a sheep rearing and breeding base in *Gaomi*, *Shandong* province. They mated in that year and produced lambs in the next year. Lambs produced from both places were weaned at 75 days of age, labeled, and used as candidate test subjects. The experiment was divided into two groups, *Shandong* group (sdlw group) and *Qinghai* group (qhlw group). In accordance with the principle of similar weight, 40 healthy 90-day-old *Hu* sheep were selected for each group, and randomly divided into 4 rearing stalls (mixed breeding between male and female) to start the routine feeding experiment. The pre-test period was 10 days, and the formal period was 150 days. At the end of the experiment, 4 rams were randomly selected from each group to be dissected to collect rumen fluid, and 16s RNA technology was used to analyze the differences in bacterial microflora of two groups and predict the function of Tax4Fun. The results showed as follows: 1) when the dietary nutrient bases were similar, the average daily weight gain in sdlw and qhlw groups is significantly different ($P<0.05$), and the difference in feed/gain is significant ($P<0.05$). Besides, the observed species index and Shannon index were not significantly different between sdlw and qhlw groups ($P>0.05$). 2) According to the analysis of Unweighted Unifrac distance PCoA, it was found that species in sdlw and qhlw groups were more similar, and species diversity was different between groups. 3) According to the species analysis, the dominant species at the level of phylum mainly included Bacteroidetes, Firmicutes and Chloroflex, and the dominant species at the level of genus were the unidentified_Prevotidae, unidentified Rumenaceae and *Bacteroides*. The dominant species were *Prevotella_sp_DJF_CP65*, *Rumen_Bacterium_NK4A214* and *Prevotella_Ruminicola*. The relative abundance of Chloroflex in sdlw group was significantly higher than that in qhlw group ($P<0.05$). However, the relative abundance of unidentified_Prevotellaceae in the qhlw group was significantly higher than that in the sdlw group ($P<0.05$), and the relative abundance of unidentified_Rumenaceae in the sdlw group was significantly higher than that in the qhlw group ($P<0.05$). 4) LEfSe analysis revealed that the f_Ruminococcaceae, g_Flexilinea, c_Anaerolineae, p_Chloroflexi and f_Anaerolineaceae played an important role in sdlw group. *Prevotella_sp_DJF_CP65* and f_Prevotellaceae played an important

* Contributed equally

** Corresponding authors: HU Shilin, professor, E-mail: sdmxhsl@163.com; XU Xiangting, professor, E-mail: sdmyxyxt@126.com

role in the qhlw group. 5) Through the analysis of the first-level functions of biological metabolic pathways, it was found that the gene expression abundance in sdlw group was higher than that in qhlw group in the four biological metabolic pathways of environmental information processing which were metabolism, cellular processes, environmental information_processings and unclassified function, and the gene expression abundance in qhlw group was higher in the aspects of genetic information processing, human disease and organic system. By analyzing the secondary functional layer, it was found that the gene expression abundance in sdlw group was significantly higher than that in qhlw group in transcription, aging, carbohydrate metabolism, biosynthesis of other secondary metabolites, membrane transport, lipid metabolism, cellular community prokaryotes, metabolism of other amino acids, metabolism, cellular processes and signaling, cell motility, cancers, xenobiotics, biodegradation and metabolism, nervous system, amino acid metabolism, signal transduction, genetic information processing. In summary, it was found that in the case of similar dietary nutrient bases, the average daily weight gain of *Hu* sheep in qhlw and sdlw groups is significantly different, and the feed/gain is significantly different; the regional differences can significantly affect the richness and diversity of *Hu* sheep. Function prediction shows that the biological metabolism pathway gene expression abundance of *Hu* sheep fed in *Shandong* are obviously better than those of *Hu* sheep fed in *Qinghai* in transcription, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, membrane transport, lipid metabolism, community prokaryote cells, metabolism, cell signaling, cell activity process and biological degradation et al. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 (9):4230-4241]

Key words: *Hu* sheep growing environment; growth performance; homologous *Hu* sheep in different regions; rumen microflora