

饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育、盲肠发酵和盲肠微生物区系的影响

孙海涛¹ 王勇^{2*} 刘公言^{1**} 徐云华² 赵桂省² 薛海鹏² 李萌³

(1.山东省农业科学院畜牧兽医研究所,山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室,济南 250100;2.山东省济南市畜牧技术推广站,济南 250100;3.济南市莱芜黑兔种业科技有限公司,济南 250100)

摘要: 本试验旨在研究饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育、小肠组织形态结构、盲肠发酵和盲肠内容物微生物区系的影响。试验选取 45 日龄育肥期莱芜黑兔 160 只,随机分为 4 组,分别饲喂以生姜秸秆替代 0(A 组)、5%(B 组)、10%(C 组)和 15%(D 组)花生秧的全价配合饲料,每组 5 个重复,每个重复 8 只家兔。预试期 7 d,正试期 47 d。结果表明:1) 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃相对重量、胃内容物相对重量和大肠内容物相对重量有显著影响($P < 0.05$),其中 C 组和 D 组的胃相对重量显著高于 A 组和 B 组($P < 0.05$),D 组胃内容物相对重量显著高于其他各组($P < 0.05$),B 组、C 组和 D 组大肠内容物相对重量显著高于 A 组($P < 0.05$)。2) 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠肌层厚度有显著影响($P < 0.05$),D 组显著高于其他各组($P < 0.05$)。3) 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量以及乙酸/(丙酸+丁酸)有显著影响($P < 0.05$),其中 D 组乙酸含量以及乙酸/(丙酸+丁酸)显著高于其他各组($P < 0.05$),丙酸和丁酸含量显著低于 A 组和 B 组($P < 0.05$)。4) 莱芜黑兔盲肠内容物微生物组成在门水平上占据主导地位的主要有厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、软壁菌门(Tenericutes),Shannon 指数在 D 组与 A 组之间存在显著差异($P < 0.05$),表明高比例生姜秸秆替代花生秧能够影响盲肠内容物微生物区系。综上所述,饲料适宜比例(5%~10%)的生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔的胃肠道发育、小肠组织形态结构、盲肠发酵和盲肠内容物微生物区系无明显不良影响,生姜秸秆可用作家兔粗饲料原料在生产上使用。

关键词: 生姜秸秆;莱芜黑兔;胃肠道发育;肠道形态结构;盲肠发酵;微生物区系

中图分类号:S829.1

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)05-2875-12

生姜在我国种植面积达 200 万 hm^2 ,全国每年生姜秸秆产量约 1 000 万 t。然而在山东莱芜、安丘、昌邑等生姜主产区,生姜秸秆被随意抛弃焚烧,造成资源浪费和环境污染^[1]。随着家兔生产的规模化,常规饲料资源日益缺乏,给养兔业的发展带来了巨大的挑战。

挖掘非常规饲料、拓宽饲料种类是促进家兔生产持续健康发展的关键。因此,因地制宜地利用生姜秸秆既能减少资源浪费,又能缓解养兔业发展带来的粗饲料资源短缺的问题。花生是我国北方地区的重要经济作物,其收

收稿日期:2020-11-06

基金项目:山东省现代农业产业技术体系特种经济动物创新团队建设项目(SDAIT-21);山东省农业重大应用技术创新兔舍环境测控设备及大数据分析应用平台项目(SF1805301301);山东省农业良种工程(南种北繁)项目(2017LZN008)

作者简介:孙海涛(1980—),男,山东郓城人,副研究员,硕士,主要从事家兔生产相关研究。E-mail: www8888@163.com

* 同等贡献作者

** 通信作者:刘公言,助理研究员,E-mail: gongyanliu@foxmail.com

获后的副产物花生秧是家兔生产中最为经常使用的粗饲料原料^[2-4]。目前,人们对生姜的研究主要集中在地下块茎,且生姜粉作为绿色饲料添加剂具有改进畜禽生长性能、提高抗氧化性能的作用^[5]。然而关于地上部分生姜秸秆作为草食动物粗饲料原料的研究尚未见报道,生姜秸秆作为家兔粗饲料原料替代花生秧在家兔生产上的应用尚少有人进行研究。莱芜黑兔为肉用型兔,主产于鲁中地区,具有抗逆性强、繁殖力高、肉质好等突出特点,2021年,莱芜黑兔被列入国家畜禽遗传资源目录(中华人民共和国农业农村部公告第381号)。目前,莱芜黑兔是我国北方地区唯一1个家兔地方品种资源,开发利用莱芜黑兔对推动我国北方地区的兔肉消费、促进我国养兔业均衡发展具有重要意义。本课题组前期饲养试验结果表明,饲粮适宜比例(5%和10%)的生姜秸秆替代花生秧对育肥期莱芜黑兔生长性能无不良影响,但高水平替代组(15%组)的采食量提高,增长速度变慢,饲料转化率降低^[6]。因此,本试验以莱芜黑兔为研究对象,进一步探讨饲粮中不同比例生

姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育、小肠组织形态结构、盲肠发酵和盲肠内容物微生物区系的影响,为生姜秸秆作为粗饲料原料在家兔生产上应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验选用45日龄、体重相近、健康状况良好的莱芜黑兔160只,按性别和体重随机分为4组,每组5个重复,每个重复8只(公母各占1/2),分为4笼饲养,每笼2只(兔舍结构为半封闭式,自然采光和自然通风)。4组试验兔分别饲喂以生姜秸秆替代0(A组,对照组)、5%(B组)、10%(C组)和15%(D组)花生秧的全价配合饲料。试验所用生姜秸秆和花生秧营养组成见表1。饲粮参考NRC(1977)^[7]和De Blas等^[8]的育肥兔饲养标准配制而成,其组成及营养水平见表2。预试期7d,正试期47d。试验期间,试验兔每天饲喂2次,自由采食和自由饮水。

表1 生姜秸秆和花生秧营养组成(风干基础)

Table 1 Nutrient composition of ginger straw and peanut seedling (air-dry basis) %

项目 Items	干物质 DM	粗蛋白质 CP	粗脂肪 EE	中性洗 涤纤维 NDF	酸性洗 涤纤维 ADF	酸性洗 涤木质素 ADL	粗灰分 Ash	钙 Ca	磷 P
生姜秸秆 Ginger straw	89.37	11.20	1.10	52.00	44.80	6.90	17.30	1.34	0.31
花生秧 Peanut seedling	89.24	14.50	1.60	42.00	28.30	11.00	16.80	1.64	0.16

表2 饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 2 Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis) %

项目 Items	组别 Groups			
	A	B	C	D
原料 Ingredients				
玉米 Corn	15.0	15.0	15.0	15.0
豆粕 Soybean meal	10.0	10.0	10.0	10.0
麸皮 Wheat bran	20.0	20.0	20.0	20.0
玉米胚芽粕 Corn germ meal	15.0	15.0	15.0	15.0
稻壳粉 Rice hull powder	7.0	7.0	7.0	7.0
花生秧 Peanut seedling	30.0	25.0	20.0	15.0
生姜秸秆 Ginger straw		5.0	10.0	15.0

续表 2

项目 Items	组别 Groups			
	A	B	C	D
预混料 Premix ¹⁾	3.0	3.0	3.0	3.0
合计 Total	100.0	100.0	100.0	100.0
营养水平 Nutrient levels ²⁾				
消化能 DE/(MJ/kg)	10.29	10.25	10.20	10.15
粗蛋白质 CP	16.70	16.40	16.20	16.00
粗脂肪 EE	2.40	2.50	2.40	2.20
中性洗涤纤维 NDF	42.40	42.90	43.30	43.80
酸性洗涤纤维 ADF	20.30	21.10	21.93	22.69
酸性洗涤木质素 ADL	5.60	5.20	4.80	4.50
粗灰分 Ash	11.60	11.20	11.80	11.10
钙 Ca	1.54	1.75	1.64	1.55
磷 P	0.62	0.67	0.75	0.68
赖氨酸 Lys	0.75	0.74	0.73	0.73
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.48	0.47	0.46	0.45

1) 预混料为每千克饲料提供 Premix provided the following per kg of diets: VA 10 000 IU, VD₃ 2 000 IU, VE 50 mg, VK₃ 2.5 mg, 硫胺素 thiamine 5 mg, 核黄素 riboflavin 10 mg, 烟酸 nicotinic acid 20 mg, 泛酸 pantothenic acid 50 mg, 叶酸 folic acid 2.5 mg, VB₁₂ 1 mg, 氯化胆碱 choline chloride 400 mg, Fe 100 mg, Zn 50 mg, Cu 40 mg, Mn 30 mg, I 0.5 mg, Se 0.05 mg, 磷酸钙 CaHPO₄ 15 g, 氯化钠 NaCl 5 g, 赖氨酸 Lys 1.5 g, 蛋氨酸 Met 1.5 g, 其余由杂粕载体补足 the rest was miscellaneous meal carrier complement.

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

1.2 测定指标和方法

1.2.1 胃肠道发育指标的测定

试验结束当天, 每个重复选取与该重复平均体重相近的 1 只公兔和 1 只母兔称重并测量体长(即每组屠宰 10 只, 共屠宰 40 只)后屠宰, 结扎消化道相应部位, 剥离肠系膜, 用软尺测定小肠自然长度即为小肠长度。根据以下公式计算小肠相对长度:

$$\text{小肠相对长度} = \text{小肠长度 (cm)} / \text{体长 (cm)}.$$

胃、小肠和大肠(含内容物)结扎称量总重后, 用流水将肠道内容物冲洗掉, 滤纸蘸去水分后即成为胃、小肠和大肠重量(净重), 结扎后的胃、小肠、大肠的总重量减去其相应净重即为内容物的重量。根据以下公式计算其相对重量:

$$\text{某消化道或内容物相对重量 (g/kg)} = \frac{\text{某消化道或内容物重量 (g)}}{\text{宰前活体重 (kg)}}.$$

1.2.2 小肠组织形态结构的测定

采集 3 cm 空肠样品置于 4% 多聚甲醛固定液体固定, 待测样本固定状态良好后, 严格按照病理实验检测标准程序(SOP)程序进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片。使用正置白光拍照显微镜

(Nikon, Eclipse Ci-L) 拍照, 选取小肠组织的目的区域进行 40 倍成像, 成像时尽量让组织充满整个视野, 保证每张照片的背景光一致。成像完成后使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件, 统一以 μm 作为标准单位, 分别测量每张切片中 5 处完整肠绒毛高度、绒毛宽度、隐窝深度、黏膜层厚度和肌层厚度, 求取平均值作为最终值, 同时计算绒毛高度/隐窝深度。

1.2.3 盲肠发酵指标的测定

采用安捷伦公司(Agilent Technologies Inc. 美国)的 7890-5977 气质联用仪对盲肠内容物挥发性脂肪酸进行靶向代谢物检测。色谱系统采用的是 Agilent 气相色谱系统(Agilent 7890; Agilent Technologies, 美国), 根据化合物的性质, 采用 HP-5(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) 气相色谱柱, 进样量为 1 μL , 分流比 10:1, 载气为高纯氦气, 流速 1.0 mL/min; 柱温箱的初始温度为 70 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5.0 min, 以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱采用四极杆质谱检测系统(Agilent 5977; Agilent Technologies, 美国), 配有电子轰击离子源和 Mass Hunter 工作站。采用电子轰击离子源, 分析物在

单离子检测扫描模式下进行检测。优化的质谱分析条件为进样口温度 260 °C,四级杆温度 150 °C。

1.2.4 盲肠微生物多样性的测定

采集盲肠内容物样品液氮保存,送至北京诺禾致源科技股份有限公司提取 DNA,基于 Illumina Nova 测序平台测序,构建 PCR-free 文库,然后进行双末端 (paired-end) 测序,检测微生物多样性。

1.3 数据处理

所有检测指标均为每个重复的公母试验兔结果求取平均值作为该重复的最终值,用 SAS 9.1.3 统计软件中的 GLM 进行数据的方差分析,用 Duncan 氏法进行数据的多重比较,结果以平均值 (mean) ± 标准误 (SE) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育的影响

由表 3 可以看出,饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃相对重量、胃内容物相对重量和大肠内容物相对重量有显著影响 ($P < 0.05$),其中 C 组和 D 组胃相对重量显著高于 B 组和 A 组 ($P < 0.05$);D 组胃内容物相对重量显著高于其他各组 ($P < 0.05$);B 组、C 组、D 组大肠内容物相对重量显著高于 A 组 ($P < 0.05$)。饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠相对重量、小肠相对长度、小肠内容物相对重量和大肠相对重量无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 3 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育的影响

Table 3 Effects of different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets on gastrointestinal tract development of *Laiwu* black rabbits

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	A	B	C	D	
胃相对重量 Stomach relative weight/(g/kg)	11.46±0.21 ^b	11.53±0.11 ^b	12.63±0.21 ^a	12.31±0.40 ^a	0.010 8
胃内容物相对重量 Stomach relative content weight/(g/kg)	30.42±3.07 ^c	35.11±2.82 ^{bc}	38.07±1.74 ^b	43.82±0.87 ^a	0.006 3
小肠相对重量 Small intestine relative weight/(g/kg)	21.86±0.42	21.95±0.42	23.43±0.52	22.93±0.53	0.086 6
小肠相对长度 Small intestine relative length	7.09±0.21	7.56±0.14	7.50±0.17	7.33±0.34	0.495 9
小肠内容物相对重量 Small intestine content relative weight/(g/kg)	11.23±1.86	13.51±1.57	14.11±0.60	10.17±1.34	0.202 6
大肠相对重量 Large intestine relative weight/(g/kg)	24.02±0.70	25.03±0.33	24.35±0.84	24.57±1.32	0.871 4
大肠内容物相对重量 Large intestine content relative weight/(g/kg)	47.36±0.61 ^b	57.06±1.45 ^a	53.16±1.58 ^a	57.44±2.58 ^a	0.002 3

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

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

2.2 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠组织形态结构的影响

由表 4 可以看出,饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠肌层厚度有显著影响 ($P < 0.05$),其中 D 组显著高于 A 组、B 组、C 组

($P < 0.05$)。饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠绒毛高度、绒毛宽度、隐窝深度和黏膜层厚度以及绒毛高度/隐窝深度等均无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 4 饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠组织形态结构的影响

Table 4 Effects of different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets on morphology and structure of small intestine of *Laiwu* black rabbits

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	A	B	C	D	
绒毛高度 Villus height/ μm	931.28 \pm 63.46	900.61 \pm 67.56	803.88 \pm 77.44	771.05 \pm 73.70	0.353 3
隐窝深度 Crypt depth/ μm	120.21 \pm 2.46	129.78 \pm 5.56	131.73 \pm 10.47	117.10 \pm 10.54	0.515 8
绒毛宽度 Villus width/ μm	143.98 \pm 7.73	133.08 \pm 4.14	149.94 \pm 25.83	127.57 \pm 22.55	0.809 0
黏膜层厚度 Mucosal layer thickness/ μm	1 073.81 \pm 64.28	1 057.89 \pm 74.10	941.18 \pm 177.65	1 044.67 \pm 30.50	0.818 3
肌层厚度 Muscle layer thickness/ μm	92.84 \pm 11.44 ^b	106.75 \pm 0.34 ^b	102.86 \pm 5.25 ^b	145.20 \pm 7.57 ^a	0.003 3
绒毛高度/隐窝深度 V/C	7.75 \pm 0.62	6.94 \pm 0.50	6.10 \pm 1.05	6.58 \pm 1.00	0.691 8

2.3 饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠发酵的影响

由表 5 可以看出, 饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量以及乙酸/(丙酸+丁酸)有显著影响($P < 0.05$), 其中 D 组乙酸含量以及乙酸/(丙酸+丁

酸)显著高于 A 组、B 组、C 组($P < 0.05$), 丙酸和丁酸含量显著低于 A 组和 B 组($P < 0.05$)。饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠内容物 pH、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸和总挥发性脂肪酸含量无显著影响($P > 0.05$)。

表 5 饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠发酵的影响

Table 5 Effects of different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets on cecal fermentation of *Laiwu* black rabbits

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value
	A	B	C	D	
pH	6.91 \pm 0.04	6.95 \pm 0.03	7.17 \pm 0.10	6.85 \pm 0.17	0.172 4
乙酸 Acetic acid/(mg/g)	31.66 \pm 2.07 ^b	30.24 \pm 3.78 ^b	29.55 \pm 3.01 ^b	40.60 \pm 2.16 ^a	0.049 3
丙酸 Propionic acid/(mg/g)	5.25 \pm 0.11 ^a	4.67 \pm 0.14 ^a	4.41 \pm 0.24 ^{ab}	3.59 \pm 0.58 ^b	0.018 5
丁酸 Butyric acid/(mg/g)	12.52 \pm 1.08 ^a	14.69 \pm 1.36 ^a	8.56 \pm 1.24 ^b	5.57 \pm 1.01 ^b	0.000 2
异丁酸 Isobutyric acid/(mg/g)	0.43 \pm 0.11	0.46 \pm 0.06	0.60 \pm 0.05	0.43 \pm 0.15	0.596 8
戊酸 Valeric acid/(mg/g)	1.10 \pm 0.12	1.22 \pm 0.25	1.34 \pm 0.24	0.74 \pm 0.18	0.223 4
异戊酸 Isovaleric acid/(mg/g)	0.53 \pm 0.13	0.64 \pm 0.11	0.79 \pm 0.14	0.63 \pm 0.21	0.704 5
己酸 Hexanoic acid/(mg/g)	0.54 \pm 0.12	0.49 \pm 0.13	0.32 \pm 0.08	0.36 \pm 0.11	0.527 8
总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acid/(mg/g)	52.03 \pm 2.12	52.42 \pm 4.59	45.57 \pm 4.04	51.92 \pm 3.39	0.508 7
乙酸/(丙酸+丁酸) Acetic acid/(propionic acid+butyric acid)	1.78 \pm 0.14 ^b	1.56 \pm 0.17 ^b	2.28 \pm 0.25 ^b	4.43 \pm 1.12 ^a	0.002 0

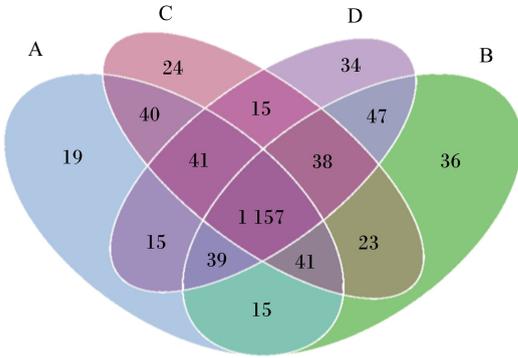
2.4 饲粮不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠微生物多样性的影响

2.4.1 物种注释分析

通过对 Reads 拼接, 平均每样品测得 106 055 条 tags, 经过质控平均得到 100 906 条有效数据, 质控有效数据量达 65 066, 质控有效率达 61.39%。以 97% 的一致性将序列聚类成为操作分类单元(OTUs), 共得到 1 586 个 OTUs, 然后

对 OTUs 序列与 Silva132 数据库进行物种注释, 并对不同分类层级统计, 发现能够注释到数据库的 OTUs 数目为 1 578 个(99.50%), 注释到界水平的比例为 99.50%, 门水平的比例为 96.22%, 纲水平的比例为 92.31%, 目水平的比例为 82.53%, 科水平的比例为 73.08%, 属水平的比例为 27.18%, 种水平的比例为 8.20%。注释结果中, 共有 431 个 OTUs 注释到属水平(27.18%);

各组 OTUs 数量见图 1。



A、B、C、D 分别代表饲粮生姜秸秆替代花生秧比例为 0、5%、10% 和 15% 组。下图同。

A, B, C and D represented the groups with 0, 5%, 10% and 15% ginger straws replacing peanut seedlings, respectively. The same as below.

图 1 OTUs 个数统计图

Fig.1 Statistical graph of OTUs counts

2.4.2 优势菌属分析

在门水平上, 莱芜黑兔盲肠内容物微生物占主导地位的主要包括厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、软壁菌门 (Tenericutes); 在纲水平上, 占主导地位的为梭菌纲 (Clostridia)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、柔膜菌纲 (Mollicutes); 在目水

平上, 优势物种为梭菌目 (Clostridiales)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、芽孢杆菌目 (Bacillales); 在科水平上, 优势物种为瘤胃球菌科 (Ruminococcaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、鼠杆菌科 (Muribaculaceae); 在属水平上, 优势物种为未鉴定瘤胃球菌科 (unidentified_Ruminococcaceae)、乳头杆菌属 (Papillibacter)、别样杆菌属 (Alistipes); 优势种为梭状芽孢杆菌 ([Clostridium]_papyrosolvens)、瘤胃球菌 (Ruminococcus_bromii)、瘤胃细菌_NK4A214 (rumen_bacterium_NK4A214)。

2.4.3 α 多样性分析

稀释曲线是生态学领域的一种常用方法, 通过从每个样本中随机抽取一定数量的序列 (即在不超出现有样本测序量的某个深度下进行重抽样), 可以预测样本在一系列给定的测序深度下, 可能包含的物种总数及其中每个物种的相对丰度。随着测试深度不断增加, OTUs 稀释曲线逐渐上升, 最后趋于平缓 (图 2-A), 说明本研究测序深度较为合理。等级聚类曲线可直观地反映样品中物种的丰富度和均匀度 (图 2-B)。以 OTUs 排序编号为横坐标, OTUs 相对丰度为纵坐标的等级聚类曲线, 在水平方向上, 曲线在横轴上跨度即曲线宽度可以反映物种丰富度; 在垂直方向上, 曲线的平滑程度反映了样本中物种的均匀程度。

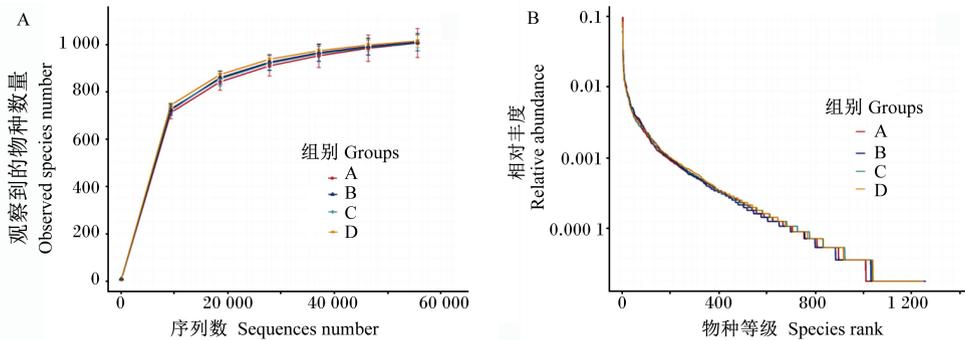
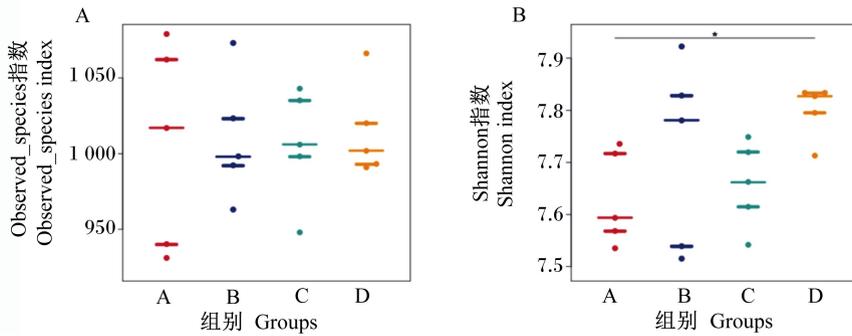


图 2 OTUs 稀释曲线 (A) 和等级聚类曲线 (B)

Fig.2 OTUs dilution curve (A) and hierarchical clustering curve (B)

蜜蜂群图展示所有样本不同组别间的物种总数的散点分布, 即丰富度。通过 Wilcoxon 秩和检验, 测得的物种数在各组间差异不显著 ($P > 0.05$; 图 3-A)。图 3-B 为 Shannon 指数的比较图, Shannon 指数在 A 组和 D 组间具有显著差异 ($P <$

0.05), 说明 A 组和 D 组间物种整体群落结构存在一定差异; Shannon 指数在 C 组和 D 组、B 组和 D 组、A 组和 B 组间差异不显著 ($P > 0.05$), 说明 C 组和 D 组、B 组和 D 组、A 组和 B 组间物种整体群落结构相似。



* 表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

* represented significant difference between groups ($P < 0.05$).

图3 可见物种指数组间差异蜜蜂群图(A)和Shannon指数组间差异蜜蜂群图(B)

Fig.3 Bees warm graph of difference between observed-species index among groups (A) and differences between Shannon index among groups (B)

2.4.4 β 多样性分析

基于 OTUs 水平的主成分分析 (PCA) 结果见图 4。应用 PCA, 能够提取出最大程度反映样本间差异的 2 个坐标轴, 从而将多维数据的差异反映在二维坐标图上, 进而揭示复杂数据背景下的简单规律。本研究结果表明, 不同组间在 PCA 图中的距离比较接近, 说明各组盲肠内容物群落组成相似。

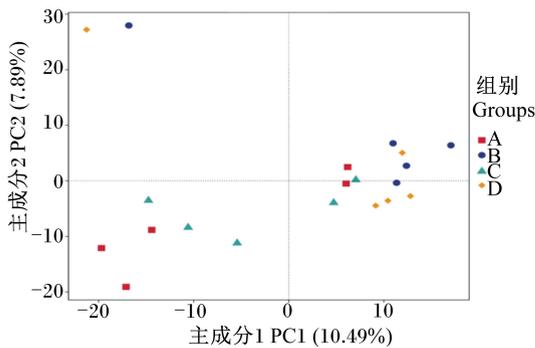


图4 基于 OTUs 水平的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis based on OTUs level

基于 OTUs 水平的 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离进行主坐标分析 (PCoA), 结果见图 5, 并选取贡献率最大的主坐标组合进行作图展示, 群落结构相似度高的样本倾向于聚集在一起, 群落差异很大的样本则会远远分开。图中各组间样本距离接近, 也表明各组盲肠内容物群落组成相似。

2.4.5 组间群落组成差异分析

利用 Meta Stat 方法对组间的物种丰度数据进行假设检验, 筛选具有显著性差异的物种, 并绘制差异物种在组间的丰度分布箱图, 各组间在门水平和属水平上丰度分布箱图分别见图 6-A 和图 6-B。

2.4.6 组间物种功能性预测分析

利用 Tax4 Fun 软件, 基于 16S Silva 数据库对莱芜黑兔盲肠内容物微生物等进行功能预测, 注释结果表明排名靠前的功能信息有新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理等 (图 7)。

3 讨论

3.1 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔胃肠道发育的影响

家兔是一种小型草食性动物, 作为非反刍单胃草食动物, 盲肠和结肠在消化系统中占有重要地位, 具有消化多种粗饲料的能力。粗饲料是家兔饲料的主要成分, 粗饲料类型及粗纤维水平不仅对家兔具有营养价值, 而且对消化道的形态和功能的发育成熟, 调控其肠道健康具有重要作用^[9-10]。Tao 等^[11]研究发现, 随着饲料中中性洗涤纤维水平升高, 家兔的胃、盲肠和结肠净重以及结肠的长度都相应增加。胃和盲肠内容物重量反映了采食和软粪产生的昼夜节律。Chao 等^[12]研究报道, 家兔的盲肠内容物的相对重量都随着饲料酸性洗涤纤维水平升高而增加。García 等^[13]的研究发现, 不同粗饲料类型能够影响家兔采食量和食糜在盲肠的停留时间, 且随着饲料中性洗涤

纤维水平的提高提高了盲肠内容物与体重的比值。本研究发现,胃、胃内容物相对重量和大肠内容物相对重量均随着饲料生姜秸秆替代花生秧比

例的提高而增大,这可能与生姜秸秆中中性洗涤纤维及酸性洗涤纤维水平高于花生秧密切相关,饲料纤维水平升高导致家兔采食量增加^[6]。

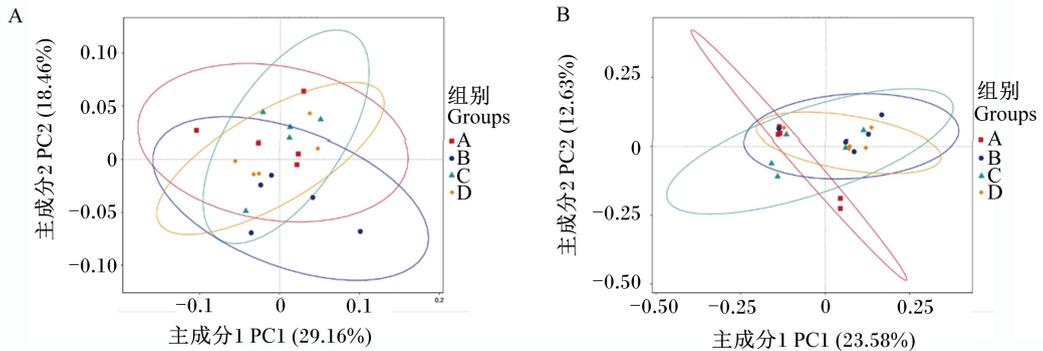


图5 基于 Weighted Unifrac 距离 PCoA 分析 (A) 和基于 Unweighted Unifrac 距离 PCoA 分析 (B)

Fig.5 PCoA analysis based on Weighted Unifrac distance (A) and Unweighted Unifrac distance based on PCoA analysis (B)

3.2 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠组织形态结构的影响

小肠是家兔消化道营养吸收的主要部位,饲料纤维水平及类型能够影响小肠组织形态结构。Yu 等^[14]报道,喂饲 55~145 g/kg 粗纤维的生长兔中,空肠绒毛高度发生轻微变化。Chiou 等^[15]研究表明,不同纤维类型能够影响家兔空肠和结肠绒毛高度和肌层厚度,并影响十二指肠和回肠的隐窝深度。然而,Xiccato 等^[16]并没有检测到饲料纤维/淀粉比率对家兔小肠绒毛高度和隐窝深度产生显著影响。本研究表明,饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔小肠绒毛高度、绒毛宽度和黏膜层厚度等影响均无显著差异,但 15% 替代组的小肠肌层厚度明显提高,这可能是由该组饲料中纤维水平高于其他各组所致。

3.3 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠发酵的影响

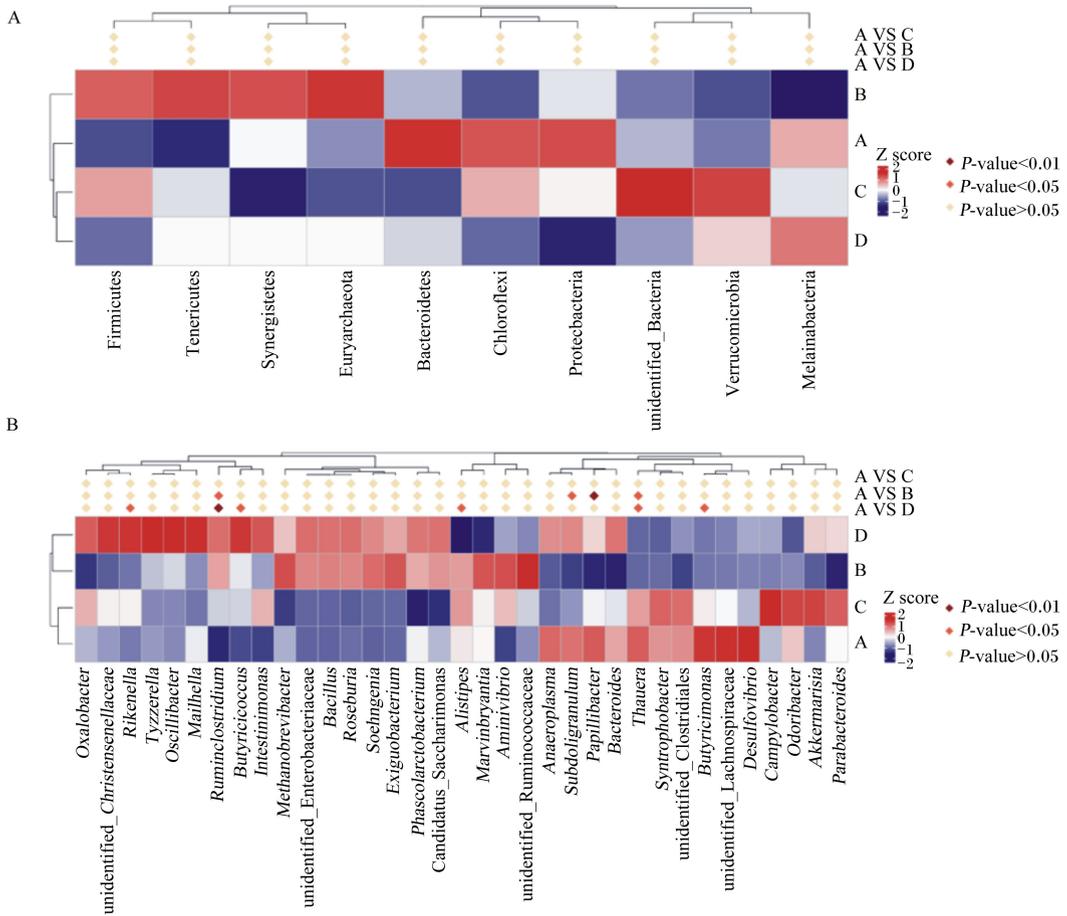
家兔盲肠内存在有大量的微生物,盲肠微生物能够发酵纤维素产生挥发性脂肪酸为家兔提供能量。盲肠挥发性脂肪酸含量随着饲料中糖醛酸和中性洗涤纤维含量的增加而升高,随着木质素含量的增加而下降^[12]。Chiou 等^[15]利用分离出的饲料纤维组分(纤维素、果胶和木质素)和苜蓿干草饲喂家兔,试验结果也表明,木质素会抑制盲肠挥发性脂肪酸的产生。乙酸是家兔盲肠挥发性脂肪酸的重要组成部分,其次是丁酸,最少的是丙

酸,其组成与饲料纤维含量和类型密切相关^[12]。本研究发现,饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠内容物 pH 及总挥发性脂肪酸含量无显著影响,但挥发性脂肪酸组成(乙酸、丙酸和丁酸含量)发生变化,这是由生姜秸秆和花生秧 2 种不同粗饲料原料的纤维组分不同所致。

3.4 饲料不同比例生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔盲肠内容物微生物区系的影响

盲肠微生物群落是在长期进化过程中形成的,与宿主保持相对平衡的稳定状态,在营养物质新陈代谢和肠道黏膜免疫调节等方面发挥着重要作用,是一个复杂的微生态系统^[17]。肠道微生物菌群和宿主的生态平衡可维持动物机体肠道健康和生产性能提高。高通量测序技术是研究动物肠道微生物多样性的主要手段。本试验通过稀释曲线、丰度等级曲线分析,得到测序深度充分、测序量合理、足以覆盖群落物种组成,能够真实反映群落各物种间的相对比例关系。本研究发现,家兔盲肠内容物在门水平上相对丰度最大是厚壁菌门,其次是拟杆菌门,厚壁菌门与碳水化合物和蛋白质的吸收有关,拟杆菌门主要是促进碳水化合物发酵、吸收和降解多糖,这两大菌门的稳定对促进肉兔肠道健康十分重要,这与许多研究所得家兔盲肠微生物的结果^[18-21]相一致。Abecia 等^[22]报道,饲料是影响笼养家兔盲肠微生物组成比例的主要因素,本研究也发现饲料适宜比例生姜秸

秆替代花生秧后莱芜黑兔盲肠内容物微生物区系 无明显变化, 过量替代后微生物区系会发生变化。



Firmicutes: 厚壁菌门; Tenericutes: 软壁菌门; Synergistetes: 互养菌门; Euryarchaeota: 广古菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Chloroflexi: 绿弯菌门; Proteobacteria: 变形菌门; unidentified_Bacteria: 未经鉴定的细菌门; Verrucomicrobia: 疣微菌门; Melainabacteria: 黑水仙菌门; Oxalobacter: 草酸杆菌属; unidentified_Christensenellaceae: 未经鉴定的克里斯滕森菌属; Rikenella: 理研菌属; Tyzzerella: 毛螺菌属; Oscillibacter: 口腔杆菌属; Mailhella: 梅伊拉菌属; Rumnicoccus: 乳虹膜球菌瘤胃菌属; Butyricoccus: 丁酸球菌属; Intestinimonas: 肠杆菌属; Methanobrevibacter: 甲烷杆菌属; unidentified_Enterobacteriaceae: 未经鉴定的肠杆菌科; Bacillus 芽孢杆菌属; Roseburia: 罗氏菌属; Soehngenia: 毛螺菌属; Exiguobacterium: 微小杆菌属; Phascolarctobacterium: 考拉杆菌属; Candidatus_Saccharimonas: 酵母梭菌属; Alistipes: 另枝菌属; Marvinbryantia: 马文布氏菌属; Aminivibrio: 氨基酸降解菌属; unidentified_Ruminococcaceae: 未经鉴定的瘤胃球菌科; Anaeroplasm: 厌氧原体属; Subdoligranulum: 罕见小球菌属; Papillibacter: 乳头杆菌属; Bacteroides: 拟杆菌属; Thauera: 索氏菌属; Syntrophobacter: 互营杆菌属; unidentified_Clostridiales: 未经鉴定的梭菌目; Butyricimonas: 丁酸弧菌属; unidentified_Lachnospiraceae: 未经鉴定的毛螺菌科; Desulfovibrio: 脱硫弧菌属; Campylobacter: 弯曲菌属; Odoribacter: 臭杆菌属; Akkermaria: 嗜黏蛋白菌属; Parabacteroides: 副拟杆菌属。

图 6 门水平组间群落组成分析 (A) 和属水平组间群落组成分析 (B)

Fig.6 Analysis of community composition among groups at phylum level (A) and genus level (B)

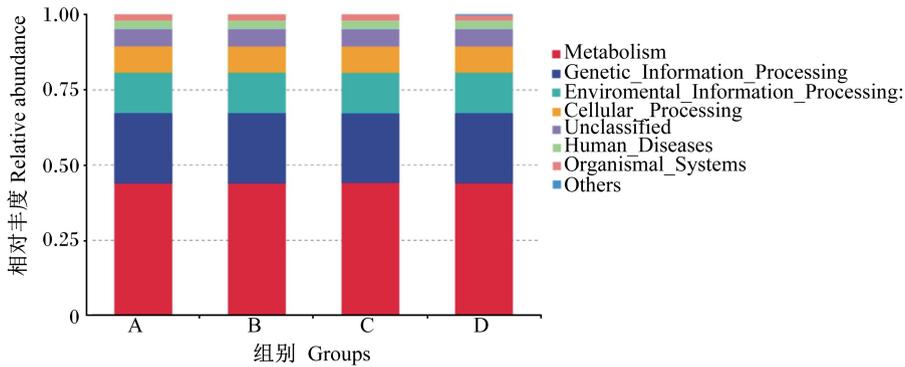


图7 Tax4 Fun 功能注释相对丰度柱形图

Fig.7 Column chart of relative abundance of Tax4 Fun function notes

Metabolism: 新陈代谢; Genetic_Information_Processing: 遗传信息处理; Enviromental_Information_Processing: 环境信息处理; Cellular_Processing: 细胞处理; Unclassified: 未经鉴定分类; Human_Diseases: 人类疾病; Organismal_Systems: 生物系统; Others: 其他。

4 结论

饲粮适宜比例(5%~10%)的生姜秸秆替代花生秧对莱芜黑兔的胃肠道发育、小肠组织形态结构、盲肠发酵和盲肠内容物微生物区系无明显不良影响,生姜秸秆可用作家兔粗饲料原料在生产上使用。

参考文献:

- [1] 高强,孙志民,张成保.大姜秸秆的应用现状、对策及技术展望[J].农业装备与车辆工程,2019,57(增刊):178-181.
GAO Q,SUN Z M,ZHANG C B.Current situation, countermeasures and technology prospect of ginger straw[J].Agricultural Equipment and Vehicle Engineering,2019,57(Suppl.):178-181.(in Chinese)
- [2] 陆小虹,冯清泉.花生秧粉代替苜蓿草粉对兔饲养效果的初步观察[J].上海实验动物科学,1995,15(4):233-234.
LU X H,FENG Q Q.Preliminary observation on the feeding effect of peanut seedling powder instead of alfalfa powder on rabbits[J].Shanghai Laboratory Animal Science,1995,15(4):233-234.(in Chinese)
- [3] 田小蜜,苏加义.用花生藤粉饲喂繁殖獭兔的应用研究[J].安徽农学通报,2009,15(9):189,211.
TIAN X M,SU J Y.Study on the application of peanut vine powder in breeding Rex rabbits[J].Anhui Agricultural Bulletin,2009,15(9):189,211.(in Chinese)
- [4] 马佳,郭东新,田河,等.花生秧在肉兔中的表观消化

能和主要养分消化率的评定[J].饲料工业,2010,31(21):62-64.

MA J, GUO D X, TIAN H, et al. Evaluation of apparent digestibility and digestibility of main nutrients of peanut seedlings in meat rabbits [J]. Feed Industry, 2010, 31(21): 62-64. (in Chinese)

- [5] 杨在宾,于彩云,周雪梅,等.生姜粉在饲料储藏和畜禽生产中应用研究进展[J].饲料工业,2018,39(18):1-8.

YANG Z B, YU C Y, ZHOU X M, et al. Research progress of application of ginger powder in feed storage and livestock production [J]. Feed Industry, 2018, 39(18): 1-8. (in Chinese)

- [6] 刘公言,王勇,赵桂省,等.饲粮不同生姜秸秆替代花生秧比例对莱芜黑兔生长性能、屠宰性能和肌肉品质的影响[J/OL].动物营养学报:1-10[2021-01-17].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5461.S.20201218.0938.002.html>.

LIU G Y, WANG Y, ZHAO G S, et al. Effects of different ginger straws replacing peanut seedlings diets on growth performance, slaughter performance and meat quality of *Laiwu* black rabbits [J/OL]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 1-10 [2021-01-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5461.S.20201218.0938.002.html>. (in Chinese)

- [7] NRC. Nutrient requirements of rabbits [S]. 2nd ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1977.
- [8] DE BLAS C, WISEMAN J. The nutrition of the rabbit [M]. New York: CABI Publishing, 1998: 297-308.
- [9] MARGÜENDA I, NICODEMUS N, VADILLO S, et al. Effect of dietary type and level of fibre on rabbit

- carcass yield and its microbiological characteristics [J]. *Livestock Science*, 2012, 145(1/2/3): 7-12.
- [10] 刘磊, 李福昌. 肉兔营养需要量研究进展[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(10): 4765-4769.
- LIU L, LI F. Research progress of nutrient requirements of meat rabbits [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(10): 4765-4769. (in Chinese)
- [11] TAO Z Y, LI F C. Effects of dietary neutral detergent fibre on production performance, nutrient utilization, caecum fermentation and fibrolytic activity in 2- to 3-month-old New Zealand rabbits [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2006, 90(11/12): 467-473.
- [12] CHAO H Y, LI F C. Effect of level of fibre on performance and digestion traits in growing rabbits [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2008, 144(3/4): 279-291.
- [13] GARCÍA J, CARABAÑO R, DE BLAS J C. Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(4): 898-905.
- [14] YU B, PETER W S. Effects of crude fibre level in the diet on the intestinal morphology of growing rabbits [J]. *Laboratory Animal*, 1996, 30(2): 143-148.
- [15] CHIOU P W S, YU B, LIN C. Effect of different components of dietary fiber on the intestinal morphology of domestic rabbits [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1994, 108(4): 629-638.
- [16] XICCATO G, TROCINO A, CARRARO L, et al. Digestible fibre to starch ratio and antibiotic treatment time in growing rabbits affected by epizootic rabbit enteropathy [C] // *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress*. Verona, Italy: [s.n.], 2008: 847-851.
- [17] VAAHTOVUO J, KORKEAMÄKI M, MUNUKKA E, et al. Microbial balance index—A view on the intestinal microbiota [J]. *Livestock Science*, 2007, 109(1/2/3): 174-178.
- [18] 武帅, 郭东新. 饲料中添加花生秧对伊拉兔肠道菌群的影响 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(6): 2735-2744.
- WU S, GUO D X. Effects of adding peanut seedlings in diet on intestinal microflora of Ira rabbits [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(6): 2735-2744. (in Chinese)
- [19] 郑建婷, 冯国亮, 曹亮, 等. 柠檬酸对伊拉肉兔盲肠微生物多样性及代谢产物的影响 [J]. *动物营养学报*, 2020, 32(8): 3808-3818.
- ZHENG J T, FENG G L, CAO L, et al. Effects of citric acid on caecal microbial diversity and metabolites of Ira rabbits [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(8): 3808-3818. (in Chinese)
- [20] MONTEILS V, CAUQUIL L, COMBES S, et al. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(3): 620-629.
- [21] WU Z Y, ZHOU H J, LI F C, et al. Effect of dietary fiber levels on bacterial composition with age in the cecum of meat rabbits [J]. *MicrobiologyOpen*, 2018, 8(5): e00708.
- [22] ABECIA L, RODRÍGUEZ-ROMERO N, YAÑEZ-RUIZ D R, et al. Biodiversity and fermentative activity of caecal microbial communities in wild and farm rabbits from Spain [J]. *Anaerobe*, 2012, 18(3): 344-349.

Effects of Different Ratios of Ginger Straw Substituted for Peanut Seedling in Diets on Gastrointestinal Development, Cecal Fermentation and Cecal Microflora of *Laiwu* Black Rabbits

SUN Haitao¹ WANG Yong^{2*} LIU Gongyan^{1**} XU Yunhua² ZHAO Guisheng²
XUE Haipeng² LI Meng³

(1. Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Shandong Province Jinan Animal Husbandry Technology Extension Station, Jinan 250100, China; 3. Jinan Laiwu Black Rabbit Seed Industry Technology Co., Ltd., Jinan 250100, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets on gastrointestinal development, histological structure of small intestine, cecal fermentation and cecal microflora of *Laiwu* black rabbits. A total of 160 fattening *Laiwu* black rabbits at 45 days of age were randomly divided into 4 groups with 5 replicates in each group and each replicate contained 8 rabbits. Rabbits in the 4 groups were fed diets with 0 (group A), 5% (group B), 10% (group C) and 15% (group D) ginger straws replacing peanut seedlings diets, respectively. The trial lasted for 7 days for adaptation, and 47 days for test. The results showed as follows: 1) different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets had significant effects on the relative weight of stomach, stomach contents and large intestine contents ($P<0.05$), among which the relative weight of stomach in group C and group D was significantly higher than that in group B and group A ($P<0.05$); the relative weight of gastric content in group D was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$); the relative weight of large intestine content in groups B, C and D was significantly higher than that in group A ($P<0.05$). 2) Different ratios of ginger straw substituted for peanut seedling in diets had significant effects on the thickness of intestinal muscle layer ($P<0.05$), and group D was significantly higher than others groups ($P<0.05$). 3) The contents of acetic acid, propionic acid, butyric acid and acetic acid/(propionic acid+butyric acid) in cecal contents of *Laiwu* black rabbits were significantly different ($P<0.05$). The acetic acid content and acetic acid/(propionic acid+butyric acid) in group D were significantly higher than those in other groups ($P<0.05$), while the contents of propionic acid and butyric acid were significantly lower than those in groups A and B ($P<0.05$). 4) The dominant microbial composition of cecal contents in *Laiwu* black rabbits was Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes, and there were significant differences in Shannon index between group D and group A ($P<0.05$), indicating that high level of ginger straw instead of peanut seedling could affect the microflora of cecal contents. In conclusion, replacing peanut seedling with the optimum level (5% to 10%) of ginger straw in diets has no obvious adverse effects on gastrointestinal development, intestinal histological structure, cecal fermentation and cecal content microflora of *Laiwu* black rabbits. Therefore, ginger straw can be used as a raw material for rabbit feed. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(5):2875-2886]

Key words: ginger straws; *Laiwu* black rabbits; gastrointestinal development; intestine histological structure; cecal fermentation; intestinal microflora

* Contributed equally

** Corresponding author, assistant professor, E-mail: gongyanliu@foxmail.com

(责任编辑 陈鑫)