

小尾寒羊与双乾肉羊的瘤胃菌群差异分析

彭洪洋¹, 李玉梅^{1*}, 赵中利², 张英¹, 白春艳¹, 闫守庆¹, 马惠海^{2*}

(1. 吉林大学动物科学学院, 长春 130062; 2. 吉林省农业科学院畜牧兽医研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 本试验旨在研究小尾寒羊(STH)及双乾肉羊(SQ)瘤胃微生物区系特征及品种间差异。随机挑选出生日期相近、初体重相近、健康的小尾寒羊和双乾肉羊各6只, 采用16S rDNA扩增子测序方法, 探究两个绵羊品种之间瘤胃微生物的差异, 预测其微生物功能。结果表明, SQ组瘤胃菌群多样性和丰富性均高于STH组; 主坐标分析和非加权组平均法聚类分析显示组间具有差异性。两个品种绵羊瘤胃菌群在门水平上组成相似, 优势菌门均为拟杆菌门、厚壁菌门及变形菌门。对差异菌群进行KEGG功能预测, 结果显示, 双乾肉羊瘤胃微生物功能大部分高于小尾寒羊。从上述分析来看, 双乾肉羊瘤胃菌群种类及丰度均高于小尾寒羊, 这可能导致了双乾肉羊饲料利用率更高。

关键词: 小尾寒羊; 瘤胃微生物; 16S rDNA; 菌群结构

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)01-0050-04

Analysis on the Difference of Ruminal Microflora between Small-Tail Han Sheep and Shuangqian Mutton Sheep

PENG Hongyang¹, LI Yumei^{1*}, ZHAO Zhongli², ZHANG Ying¹, BAI Chunyan¹, YAN Shouqing¹, MA Huihai^{2*}

(1. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The purpose of this experiment is to investigate the ruminal microflora characteristics and differences between Small-tail Han sheep (STH) and Shuangqian mutton sheep (SQ). 6 STH and 6 SQ were randomly selected, which were similar birth date, initial body weight and good health. The 16S rDNA amplicon sequencing method was applied to explore the microbial differences between the rumen of two breeds and predict the microbial function. The results indicated that the bacterial diversity and richness of rumen of Shuangqian mutton sheep are higher than those of Small-tail Han sheep. The principal coordinate analysis (PCoA) and UPGMA cluster analysis showed that the bacteria community in two groups was different. The composition of rumen microflora of the two breeds of sheep is similar at the phylum level and dominant phyla were Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. The results of KEGG pathway analysis revealed that the rumen microbial function of SQ was mostly higher than that of STH. Based on the above analysis, the species and abundance of ruminal microflora of SQ were greater compared with STH, which could lead to higher feed utilization rate of SQ.

Key words: Small-tail Han sheep; Rumen microbe; 16S rDNA; Microflora composition

瘤胃微生物对于反刍动物营养物质的消化起着重要作用, 它们协助宿主将不易利用的饲料分

解, 为宿主供能。目前的研究已经表明, 瘤胃内活跃的微生物除了细菌与真菌外, 还有古细菌、病毒和原虫^[1]。而细菌作为瘤胃内数量最巨大的一部分生物, 参与纤维素的分解、淀粉和糖的发酵、蛋白质和维生素的合成。微生物与宿主的作用是相互的。一方面, 宿主为微生物提供一个厌氧、温度适宜的环境^[2]; 另一方面, 微生物降解纤维类物质, 产生瘤胃可吸收利用的挥发性脂肪酸、菌体蛋白等, 为宿主提供可利用物质基础^[3]。诸多因素决定了微生物的结构组成和数量, 目前广为接受的是饲料影响了微生物的结构^[4], 例如

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 吉林省科技攻关项目(20190301006NY); 吉林省畜牧业管理局畜禽遗传资源多胎肉羊种群选育与开发项目(2021); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-38)

作者简介: 彭洪洋(1994-), 男, 硕士, 研究方向: 动物营养与饲料科学。

通讯作者: 李玉梅, 女, 博士, 副教授, E-mail: li_ym@jlu.edu.cn
马惠海, 男, 博士, 研究员, E-mail: mh2pc2013@163.com

饲料的精粗比、饲料的种类^[5]等。影响瘤胃微生物的重要因素还有环境和管理策略^[6-7]。此外,对于不同的宿主种类,微生物结构也表现出了差异性。小尾寒羊产肉品质优良,是具有高繁殖力的中国本地绵羊品种^[8]。双乾肉羊是吉林省农业科学院利用杜泊羊为父本、吉林省本地绵羊为母本,通过杂交、回交以及横交固定等常规育种手段结合分子标记辅助选择方法,选育出的具有采食性好、生长速度快和产仔数高等种质特性的肉用羊新种群。众多研究结果表明,杜寒杂交羊无论日增重还是屠宰性能都优于小尾寒羊^[9]。因此,当小尾寒羊及双乾肉羊在相同环境、饲喂相同饲料条件下,研究其体内微生物的组成与差异、预测微生物功能差异,为寻找与绵羊的生长速度、肉质等相关的微生物提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及试验设计

本研究选用12只出生日期相近、健康无病、体重相似的雄性绵羊,其中小尾寒羊组(STH)、双乾肉羊组(SQ)各6只,在环境、饲料与饲喂时间均相同条件下,分为两组进行饲养试验,试验于2019年3月至8月在吉林省农业科学院进行。

1.2 样品采集

在饲养试验结束后,实验动物禁食24 h,禁水2 h,屠宰后,剥离内脏,收集瘤胃液于50 mL已灭菌的离心管中,并立刻置于干冰中暂时保存,送回实验室保存于-80 °C冰箱,用于后续试验。

1.3 提取瘤胃微生物基因组DNA与构建基因文库

使用E.Z.N.A.®StoolDNAKit,并按照说明书,对瘤胃细菌总DNA进行提取。使用细菌通用引物341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')对16S rRNA可变区V3+V4进行PCR扩增。使用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,并回收目标片段。纯化后的PCR产物在Qbit荧光定量系统上进行定量,文库浓度在2 nmol/L以上视为合格。将合格的文库使用MiSeq测序仪进行2×300 bp的双端测序。本试验中建库及测序由杭州联川生物技术有限公司提供。

1.4 16S rDNA 基因文库分析

原始读数数据在特定的过滤条件下进行质量过滤、嵌合序列过滤、解调,获得特征序列。经QIIME2计算出Alpha多样性指数及UniFrac距离,并用于主坐标分析(PCoA)及非加权聚类树分析

(UPGMA)。采用Blast进行序列比对,每个代表性序列用SILVA数据库列进行注释。

1.5 功能预测

基于高质量序列,使用PICRUSt预测微生物基因组的功能。PICRUSt通过QIIME软件将特征序列比对到数据库,将预测到的基因与KEGG数据库进行比对。

2 结果与分析

2.1 样品及特征序列数

本研究在两组绵羊的瘤胃细菌的V3+V4可变区经16S rDNA进行扩增、测序,获得1 017 984条原始reads,去除低质量的序列后,产生912 911条高质量序列,平均每个样本有(76 076±1 706)条,用于后续研究。对扩增子测序数据进行过滤、去重、过滤嵌合体等,共获得了6 632条特征序列,不考虑处理效应,平均每个样本有(553±47)条。其中,SQ组特有1 552条,STH组特有1 191条。共享特征序列为541条,约占本次测序中全部特征序列的18.75%。

2.2 Alpha多样性

为了探索两个绵羊品种瘤胃微生物群落组成,本研究初步评估了瘤胃微生物Alpha多样性。结果显示,SQ组瘤胃微生物的Alpha多样性指数Chao1、Simpson高于STH组,Chao1与Simpson值越大代表物种总数越多,具体见表1。并且Shannon指数显著高于STH组($P<0.05$),Shannon指数值越大,群落多样性越高。覆盖率指样品文库覆盖度,该值越大,表示样品中没有被测到的概率越低。这表明,SQ组瘤胃菌群多样性和丰富性均高于STH组,且样品文库覆盖度优良。

表1 两组绵羊样品瘤胃细菌Alpha多样性指数

项目	SQ组	STH组	P值
香农指数	6.86±0.71	6.43±0.19	0.04
辛普森指数	0.97±0.02	0.96±0.07	0.31
丰富度指数	576.60±85	522.97±38	0.18
覆盖率(%)	99.82±0.04	99.82±0.02	0.39

注: $P<0.05$ 表示差异显著, $P>0.05$ 表示差异不显著

2.3 Beta多样性

UniFrac距离度量用于评估样品中Beta多样性的变化,该变化与微生物群落组成的结构差异相对应。基于该距离,对样品进行了主坐标分析(PCoA),结果如图1所示。由图1可知,无论是STH组,还是SQ组,多数组内样本都汇聚在一起,

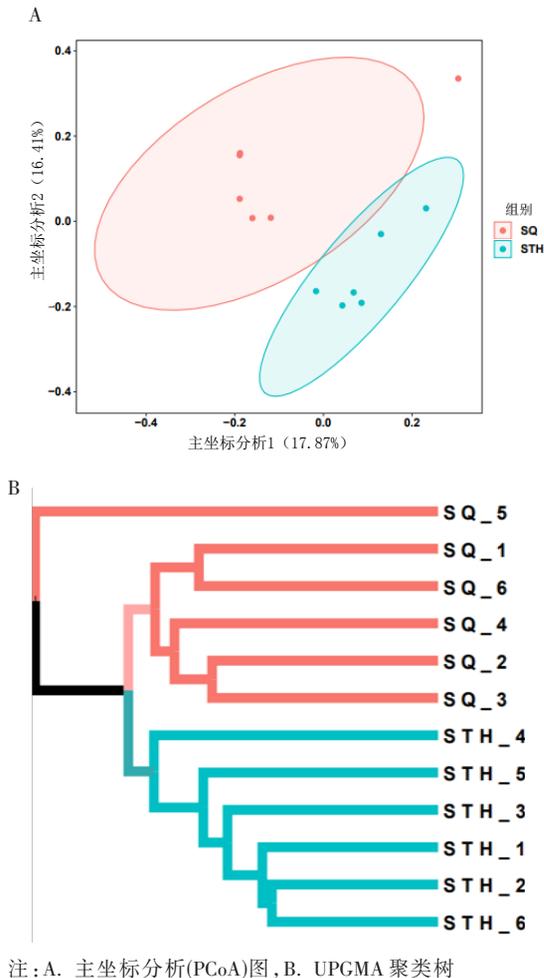


图1 基于非加权距离的小尾寒羊与双乾肉羊瘤胃细菌 beta 多样性

说明组内瘤胃微生物差异较小。图中两组样品聚为两类,表明两个组的微生物区系存在明显的差异,且UPGMA树结果进一步说明了两组绵羊瘤胃微生物的差异性。

2.4 不同水平菌群结构与组成

本次测序统计了各分类水平上相对丰度 top30 的菌落。在 SQ 组瘤胃微生物门水平上,拟杆菌门和厚壁菌门是最主要的菌门,它们各自占了该组总菌门的 47.44% 和 31.09%,其次是变形菌门、放线菌门和纤维杆菌门,分别占 14.79%、3.50% 和 2.11%。在 STH 组中,拟杆菌门和厚壁菌门是优势菌门,其比例分别是 45.14% 和 28.05%;变形菌门、纤维杆菌门和 SQ 组相比,丰度无显著差异($P>0.05$)。但 STH 组放线菌门(9.25%)显著高于 SQ 组(3.52%)($P<0.05$)。在属水平上, SQ 组相对丰度前 9 个菌属为:普雷沃菌属_7、琥珀酸菌科_UCG-001、普雷沃菌属、沙特尔沃思菌属、毛螺旋菌科_NK3A20_群、戴阿利斯特杆菌属、月形单胞菌属、欧陆森氏菌属和丝状杆菌属。对应地,STH

组中丰度前十菌属为:普雷沃菌属_7、琥珀酸菌科_UCG-001、普雷沃菌属、欧陆森氏菌属、琥珀酸菌科_UCG-001、月形单胞菌属、假斯卡多维亚菌属、戴阿利斯特杆菌属、丝状杆菌属和巨球形菌属。这些结果均表明,小尾寒羊及双乾肉羊瘤胃微生物组成存在差异性。门水平与属水平菌群堆叠图如图 2 所示。

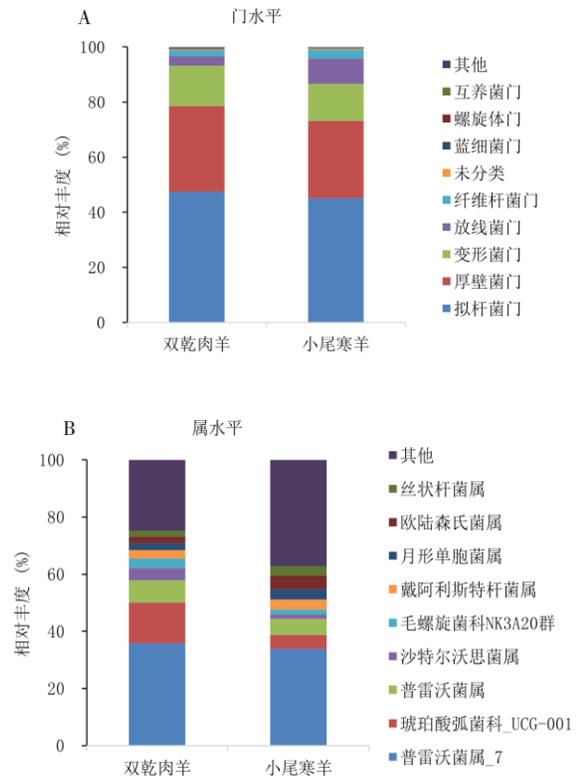


图2 基于不同分类水平瘤胃菌群结构

3 功能预测

基于 16S rDNA 测序与来自两组绵羊微生物的差异,该研究应用 PICRUSt 对特征序列丰度表进行标准化,并使用 KEGG 进行富集分析。本次试验对相对丰度大于 0.1% 菌落功能预测进行统计,结果显示, SQ 组二级通路相对丰度都显著高于 STH 组,这些功能包括氨基酸代谢、其他次级代谢产物的生物合成、碳水化合物代谢、细胞运动、内分泌系统、传染性疾病、膜转运、其他氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮化合物代谢、神经系统、感官系统、信号分子与相互作用($P<0.05$)。此外,对于富集到的三级通路, SQ 组功能预测中约 90% 显著高于 STH 组, STH 组中仅有三个功能显著高于 SQ 组。二级通路富集结果见表 2。

表2 KEGG 富集二级通路

描述	SQ组	STH组	P值
氨基酸代谢	0.110 6	0.099 5	0.046 8
其他次生代谢产物的生物合成	0.006 0	0.001 8	0.026 8
碳水化合物代谢	0.080 3	0.039 5	0.002 4
细胞运动	0.007 2	0.005 7	0.029 9
内分泌系统	0.007 8	0.000 7	0.033 8
传染性疾病	0.014 4	0.010 5	0.040 5
膜转运	0.107 3	0.074 3	0.001 1
其他氨基酸代谢	0.015 8	0.009 6	0.022 1
萜类化合物和聚酮化合物代谢	0.012 7	0.005 4	0.040 7
神经系统	0.000 3	0.000 1	0.018 8
感官系统	0.000 2	0.000 0	0.043 9
信号分子与相互作用	0.011 8	0.004 6	0.000 2

4 讨 论

反刍动物瘤胃内微生物菌群使得宿主在多维、低质量的饲料中获得更多的能量。反刍动物菌群结构受到宿主营养水平^[10]、环境、年龄^[11]、进食习惯^[12]及宿主的影响。本试验中,所有羊在出生日期相近、断奶日龄相似、饲喂情况一致条件下,在一定程度上减少了其他因素对瘤胃微生物的影响。本试验通过对瘤胃细菌进行16S rDNA测序,平均每个样本获得了(76 076±1 706)条高质量序列,高于Yang等^[13]在小尾寒羊与大尾寒羊中的研究,这可能与试验动物的生理状况、营养水平^[3-4]及月龄^[14]有关。此外,本试验中,SQ组的Alpha多样性指数均高于STH组,且Shannon指数显著高于STH组,这表明,SQ有更丰富且更均匀的微生物群落。共有特征序列分析显示,两组羊有541个核心的特征序列。这些共有特征序列是瘤胃长久的寄居者,并且这种寄居是在宿主进化过程中形成的^[13]。通过PCoA及UPGMA对两组绵羊瘤胃微生物进行评估,结果表明两组绵羊瘤胃微生物群落存在差异。

菌群的结构已经在小鼠^[15]、仔猪^[16]、马^[17]、驴^[18]、斑马鱼^[19]、鸡^[20]和骆驼^[21]等动物中有所研究。在本试验中,一共注释到门水平丰度超过1%的5个菌门,且这5个菌门类在两组绵羊中一致,但丰度有差异。小尾寒羊优势菌门为拟杆菌门及厚壁菌门,占总菌门73%,这一结果与Yang等^[13]研究一致,但明显低于其他动物研究中的98%^[22]。在牛瘤胃微生物研究中,拟杆菌门及厚壁菌门高达51%与42%^[23];消化道厚壁菌门与拟杆菌门比例的变化,影响了小鼠肥胖率^[24]、人类能量吸收^[25-26]

和奶牛产奶量^[27]。小尾寒羊与双乾肉羊不同的厚壁菌门及变形菌门比例,可能影响绵羊的体重增长速度。在圈养的瘤胃动物中,厚壁菌门大多低于变形菌门,但本研究中,变形菌门丰度最大,这可能是饲喂草料比例较低造成的。本研究中,双乾肉羊瘤胃内寄居着更高比例的厚壁菌门菌群,厚壁菌门含有许多成员,其功能与溶解纤维蛋白及纤维素分解活性相关^[28],这表明在双乾肉羊瘤胃内,更多菌参与瘤胃内容物分解和消化。因此推测,与小尾寒羊相比,双乾肉羊瘤胃微生物分解纤维类物质效率更高,产生更多的乙酸,促进机体脂肪积累,育肥速度更快。

在KEGG一级通路富集结果中,大部分差异基因被富集到了新陈代谢途径,表明两组绵羊瘤胃内新陈代谢可能存在差异。KEGG二级通路功能预测结果中,主要在氨基酸代谢、其他次生代谢产物的生物合成和碳水化合物代谢等途径中存在差异。双乾肉羊瘤胃微生物富集到的大部分通路都显著高于小尾寒羊,在相同的环境下,双乾肉羊新陈代谢更快,因而日增重更高。

5 结 论

在小尾寒羊与双乾肉羊瘤胃中,优势菌门是拟杆菌门、厚壁菌门及变形菌门,普雷沃菌属_7为两组绵羊核心菌属。小尾寒羊与双乾肉羊瘤胃微生物的多样性和功能存在差异,差异菌群集中在厚壁菌门下。功能上的差异主要与新陈代谢相关,且大多数富集结果在双乾肉羊中显著增高,差异菌群可能促使双乾肉羊从饲料中获取更多的能量,从而更快地生长。

参考文献:

- [1] Firkins J L, Yu Z. Ruminant nutrition symposium: how to use data on the rumen microbiome to improve our understanding of ruminant nutrition[J]. Journal of Animal Science, 2015, 93(4): 1450-1470.
- [2] Lees A M, Sejian V, Lees J C, et al. Evaluating rumen temperature as an estimate of core body temperature in Angus feedlot cattle during summer[J]. International Journal of Biometeorology, 2019, 63(7): 939-947.
- [3] 李 旺. 瘤胃挥发性脂肪酸的作用及影响因素[J]. 中国畜牧杂志, 2012(7): 63-66.
- [4] 涂 瑞, 苗建军, 彭忠利, 等. 不同精粗比日粮中添加小肽对牦牛瘤胃体外发酵特性的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(3): 78-88.
- [5] 贺 宁, 高 强, 郭彩云. 不同水平的青贮饲料对饲喂稻草秸秆奶牛瘤胃微生物数量和微生物(下转第107页)

- methyl[J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1803–1810.
- [41] Varela-Martínez D A, González-Curbelo M Á, González-Sálamo J, et al. Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124961.
- [42] Pisani C, Voisin S, Arafah K, et al. Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture[J]. Alternatives to Animal Experimentation, 2016, 33(4): 393–413.
- [43] Liu H H, Wang C, Lu X Y, et al. Improved production of arachidonic acid by combined pathway engineering and synthetic enzyme fusion in *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(35): 9851–9857.
- [44] Zhou H Y, Yong J, Gao H, et al. Mannanase Man 23 mutant library construction basing on a novel cell-free protein expression system[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(7): 2199–2204.
- (责任编辑:王丝语)
-
- (上接第 53 页)蛋白合成的影响[J]. 中国饲料, 2020(2): 60–64.
- [6] Ripple W J, Smith P, Haberl H, et al. Ruminants, climate change and climate policy[J]. Nature Climate Change, 2014, 4(1): 2–5.
- [7] Huws S A, Creevey C J, Oyama L B, et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future[J]. Frontiers in Microbiology, 2018(9): 2161–2194.
- [8] 王根林, 毛鑫智, George H D, 等. DNA 分析发现我国湖羊和小尾寒羊存在 *Booroola(FecB)* 多胎基因[J]. 南京农业大学学报, 2003(1): 104–106.
- [9] 闫秋良, 张云影, 宋玉贵, 等. 杜寒羊杂交效果研究报告[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 32–35.
- [10] Joshua C M, Tryon A W, Juan J L. High-throughput methods re-define the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism[J]. Bioinformatics and Biology Insights, 2014, 8: 109–125.
- [11] Jami E, Israel A, Kotsera, et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. The ISME Journal, 2013, 7(6): 1069–1079.
- [12] Prendiville R, Lewis E, Pierce K M, et al. Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(2): 764–774.
- [13] Yang G, Zhang S, Li Z, et al. Comparison between the gut microbiota in different gastrointestinal segments of Large-tail Han and Small-tail Han sheep breeds with high-throughput sequencing[J]. Indian Journal of Microbiology, 2020, 60(4): 436–450.
- [14] 李晓斌, 赵国栋, 刘 振, 等. 3~6 月龄伊犁马肠道微生物群落多样性的研究[J]. 动物营养学报, 2017, 29(5): 1535–1544.
- [15] Gu S, Chen D, Zhang J N, et al. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract[J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e74957.
- [16] 司景磊, 黄 叶, 陈奎蓉, 等. 基于 16S rRNA 测序揭示杜洛克猪早期体重与肠道微生物的关系[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 190–199.
- [17] Costa M C, Arroyo L G, Allen V E, et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3–V5 region of the 16S rRNA gene[J]. PLoS ONE, 2012, 7(7): 1–11.
- [18] Liu X F, Fan H L, Ding X B, et al. Analysis of the gut microbiota by high-throughput sequencing of the V5–V6 regions of the 16S rRNA gene in donkey[J]. Current Microbiology, 2014, 68(5): 657–662.
- [19] Stephens W Z, Adam R B, Keaton S. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development[J]. The ISME Journal, 2015, 10: 644–654.
- [20] Choi J H, Kim G B, Cha C J. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2014, 93(8): 1942–1950.
- [21] Jing H, Li Y, Le H, et al. Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 654.
- [22] Mao S Y, Zhang M L, Liu J H, et al. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16116.
- [23] Elie J, Itzhak M. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33306.
- [24] Ruth E L, Fredrik B, Peter T, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31): 11070–11075.
- [25] Ruth E L, Peter J T, Samuel K, et al. Microbiome ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444: 1022–1023.
- [26] Turnbaugh P J, Ruth E L, Mahowald M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [27] Kittelmann S, Cesar S, Patiño P, et al. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep[J]. PLoS ONE, 2014, 9(7): e103171.
- [28] Honglada T, Wuttichai M, Tsthaporn L, 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.
- (责任编辑:刘洪霞)