

网络出版时间:2023-02-10 08:33

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2023.08.001

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//61.1390.S.20230209.1632.009.html

犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃菌群结构比较及 功能预测研究

马小勇^{1,2,3}, 谭义洲^{1,2}, 任稳稳^{1,2}, 马晓明^{1,2}, 吴晓云^{1,2}, 喇永福^{1,2},
褚敏^{1,2}, 郭宪^{1,2}, 阎萍^{1,2}, 梁春年^{1,2,3}

(1 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所 甘肃省牦牛繁育工程重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 2 农业农村部青藏高原
畜禽遗传育种重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 3 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

【摘要】【目的】分析犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物多样性的差异,并对菌群功能进行预测。【方法】选取甘
南藏族自治州合作市同一牧场放养的生理状态正常、年龄相近(1.5 岁左右)的犏牛、黄牛和娟姗牛各 6 头,抽取瘤胃
液于冻存管,放入液氮保存。基于 16S rRNA 测序技术,对供试牛瘤胃液样本基因组 DNA 进行 V3~V4 区扩增及测
序,对所得序列处理后进行 OTU 聚类分析和物种分类,并利用 Tax4Fun 对菌落的 16S rRNA 基因序列进行 KEGG
功能注释。【结果】Alpha 多样性分析显示,犏牛瘤胃微生物多样性和丰富度显著高于黄牛和娟姗牛($P<0.05$)。门
分类水平上,犏牛瘤胃液中厚壁菌门、脱硫杆菌门、疣微菌门、酸杆菌门和纤维菌门显著高于黄牛($P<0.05$),脱硫
杆菌门和疣微菌门显著高于娟姗牛($P<0.05$)。属分类水平上的差异主要表现在厚壁菌门与拟杆菌门所属的各菌群
中,犏牛瘤胃液中普雷沃菌属、瘤胃球菌属和解琥珀酸菌属丰度显著低于黄牛($P<0.05$);理研菌科_RC9 菌群丰度显
著高于黄牛($P<0.05$);犏牛和娟姗牛瘤胃中克里斯氏菌科_R-7 菌群、瘤胃菌科_NK4A214 菌群、g_norank_f_UCG-
011 和未分类毛螺菌科显著高于黄牛($P<0.05$)。瘤胃菌群功能预测发现,犏牛富集在碳水化合物代谢、核苷酸代谢
和翻译二级通路上的功能丰度显著高于黄牛($P<0.05$),但与娟姗牛差异不显著($P>0.05$);黄牛二级通路中辅助因
子和维生素的代谢功能丰度显著高于犏牛和娟姗牛($P<0.05$)。【结论】犏牛和黄牛间瘤胃菌群组成差异较大,娟姗
牛菌群组成介于犏牛和黄牛之间;犏牛瘤胃菌群发酵最具优势,可能为其适应高原地区严酷的生存环境发挥了重要
作用。

【关键词】瘤胃微生物;16S rRNA;菌群结构;犏牛;黄牛;娟姗牛

【中图分类号】S823.8⁺5

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2023)08-0001-10

Comparison of rumen microbiota structure and functional prediction among Cattle yak, Cattle and Jersey

MA Xiaoyong^{1,2,3}, TAN Yizhou^{1,2}, REN Wenwen^{1,2}, MA Xiaoming^{1,2}, WU Xiaoyun^{1,2},
LA Yongfu^{1,2}, CHU Min^{1,2}, GUO Xian^{1,2}, YAN Ping^{1,2}, LIANG Chunnian^{1,2,3}

(1 Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of
Chinese Academy, Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2 Key Laboratory of Animal Genetics and
Breeding on the Tibetan Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou, Gansu 730050, China;
3 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: 【Objective】This study analyzed the differences of microbial diversity in rumen fluid of Cat-

【收稿日期】2022-05-09

【基金项目】国家重点研发计划项目(2021YFD1600200);现代肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37);甘肃省基础研究创新群体项
目(20JR5RA580);中国农业科学院创新工程项目(25-LIHPS-01);甘肃省科技重大专项(21ZD10NA001, GZGG-2021-1)

【作者简介】马小勇(1999—),男(回族),甘肃清水人,在读硕士,主要从事畜牧学研究。E-mail: mxy15609445561@163.com

【通信作者】梁春年(1973—),男,甘肃武威人,研究员,主要从事动物遗传育种研究。E-mail: chunnian2006@163.com

tle yak, Jersey and Cattle and predicted the functions of bacterial flora. 【Method】 Eighteen perennial grazing Cattle yak, Cattle and Jersey with normal physiological state, good body condition and similar age (about 1.5 years old) were randomly selected from Hezuo City, Gannan Tibetan Autonomous Prefecture, Gansu province. They were divided into three groups according to species. Rumen fluid was extracted by vacuum negative pressure device into frozen storage tube and stored in liquid nitrogen, and the V3—V4 region of genomic DNA was amplified and sequenced based on 16S rRNA sequencing technology. Then, OTU cluster analysis and species classification analysis were performed, and the 16S rRNA gene sequences of the colonies were also annotated by KEGG function using Tax4Fun. 【Result】 The diversity and richness of rumen microbes in Cattle yak were significantly higher than those in Cattle and Jersey ($P < 0.05$). At the phylum classification level, Firmicutes, Desulfobacterota, Verrucomicrobiota, Patescibacteria, Fibrobacterota and Planctomycetota in rumen fluid of Cattle yak were significantly higher than those of Cattle ($P < 0.05$), and Desulfobacterota and Verrucomicrobiota of Cattle yak were significantly higher than those of Jersey ($P < 0.05$). The differences in genus level were mainly in the flora belonging to Firmicutes and Bacteroidetes. The abundance of *Prevotella*, *Ruminococcus* and *Succinobacteria* in rumen fluid of Cattle yak was significantly lower than that of Cattle ($P < 0.05$), while the abundance of Rikenellaceae_RC9 group was significantly higher than that of Cattle ($P < 0.05$). The rumen concentrations of Christensenellaceae_R-7 group, Ruminococcaceae_NK4A214 group, g_norank_f_UCG-011 and unclassified_f_Lachnospiraceae in Cattle yak and Jersey were significantly higher than those in Cattle ($P < 0.05$). The functional prediction of rumen microbiota showed that the functional abundance of Cattle yak in the secondary pathways of carbohydrate metabolism, nucleotide metabolism and translation was significantly higher than that of cattle ($P < 0.05$), but not significantly different from Jersey ($P > 0.05$). The metabolism of cofactors and vitamins in the secondary pathway of cattle was significantly higher than that of Cattle yak and Jersey ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The rumen microbiota composition was significantly different between Cattle yak and Cattle. The composition of Jersey was between Cattle yak and Cattle. The rumen microbiota of Cattle yak had the most advantages in fermentation, which might play an important role in its adaptation to the harsh living environment on plateau.

Key words: ruminal microbial; 16S rRNA; microbiota structure; Cattle yak; Cattle; Jersey

反刍动物的瘤胃微生物群落能将难以消化的植物多糖发酵成营养物质被宿主吸收, 继而转化为人类可食用的高品质动物性蛋白(肉和奶)^[1]。瘤胃微生物主要由细菌、纤毛虫、真菌、古生菌和噬菌体等组成^[2]。影响瘤胃微生物群落的因素有宿主(品种、年龄)^[3]和环境(饲粮、瘤胃 pH)等^[4], 微生物的菌群数量和结构对宿主具有非常重要的作用^[5]。瘤胃微生物可以产生纤维素降解酶, 将饲草中的营养物质转化为挥发性脂肪酸(volatile fatty acid, VFA)和微生物蛋白质, 为宿主提供营养物质^[6]。近年来随着多组学技术的迅速发展, 瘤胃微生物的研究取得了突破性进展, 这为分析瘤胃微生物菌群结构奠定了基础。Sirohi 等^[7]基于 16S rRNA 和 *mcrA* 基因文库来确定 Karan Fries 杂交牛瘤胃中产甲烷菌的多样性, 结果表明 Karan Fries 牛瘤胃产甲烷菌以甲烷短杆菌为主。Gharechahi 等^[8]研究表明, 雄性 Taleshi 牛瘤胃微生物群落的多样性可能对不同木质纤维素

基质的消化具有重要作用。Sbardellati 等^[9]使用 16S rRNA 基因测序技术对荷斯坦奶牛瘤胃上皮 4 个部位的微生物群落进行分析, 结果发现瘤胃中不同部位的微生物群落结构和组成存在差异, 但均以拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门的成员为主。Ozbayram 等^[10]通过细菌 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因的 454 个扩增子序列分别对瘤胃和粪便样品的细菌和产甲烷菌群落进行了检测, 结果表明, 瘤胃和粪便中细菌群落有很大的差异, 瘤胃菌群以普雷沃菌科和纤维杆菌科细菌为主, 而粪便中以瘤胃球菌科细菌为主。

犏牛是利用普通牛、奶牛等品种与牦牛进行杂交产生的后代, 杂一代犏牛耐粗饲, 抗病力和使役能力等优于亲本, 生长性能好, 对高原极端环境适应性强^[11-12]。在高海拔舍饲条件下, 犏牛的饲料转化效率和生长速度高于黄牛和牦牛^[13], 且其肌肉中蛋白质、不饱和脂肪酸含量高于黄牛, 脂肪含量低于黄

牛^[14]。Zhang等^[15]对不同海拔高度反刍动物瘤胃液的理化指标进行了分析,结果发现,低海拔地区动物(黄牛、绵羊)瘤胃甲烷气体产量高于高海拔地区动物(牦牛、藏羊),而VFA产量低于高海拔地区动物。Huang等^[16]报道,同一高原牧场,牦牛产甲烷菌菌群丰度显著低于黄牛。Paul等^[17]对黄牛与水牛瘤胃菌群进行了比较,结果发现2个品种牛瘤胃液中厚壁菌门所属菌群差异显著。Iqbal等^[18]对娟姗牛与水牛瘤胃菌群进行测序分析,结果发现娟姗牛瘤胃中普雷沃氏菌属与甲烷短杆菌的丰度显著高于水牛。Ishaq等^[19]研究表明,不同地区驼鹿瘤胃内厚壁菌门和拟杆菌门的菌群丰度存在差异。Wang等^[20]报道,饲喂不同精粗比日粮可改变胃肠道菌群多样性,精料比例较高时,普雷沃氏菌属和琥珀酸菌属的丰度呈现上升趋势,粗料增加时普雷沃氏菌属丰度明显下降。上述研究表明,反刍动物品种、日粮和地理环境都是影响瘤胃微生物多样性的重要因素,而瘤胃菌群组成又对反刍动物的消化吸收有决定性影响。犏牛作为普通牛、奶牛与牦牛的杂交后代,对高原极端环境具有较强的适应性,研究其瘤胃微生物特征及其与其他品种牛的差异,对阐明犏牛适应高原环境及生产性能好的原因具有重要意义。本试验对同一牧场的犏牛、黄牛和娟姗牛的瘤胃菌群进行了研究,旨在阐明3种牛在高海拔放牧条件下瘤胃菌群的特征及差异,以期为进一步研究高原地区反刍动物瘤胃微生物提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

在甘肃省甘南藏族自治州合作市卡加道乡(平均海拔2 960 m),选取生理状态正常,体况良好,年龄相近(1.5岁左右)的放牧娟犏牛(娟姗牛×牦牛)、本地黄牛和娟姗牛各6头,采用真空负压装置抽取瘤胃液,用4层消毒纱布过滤后分装于2 mL冻存管,置于液氮罐中运回实验室,−80℃保存。

1.2 3种牛瘤胃细菌16S rRNA基因的扩增及测序

用FastDNA SPIN Kit for soil(MP Biomedicals, Santa Ana, CA)试剂盒抽提样本基因组DNA,用1%琼脂糖凝胶电泳对DNA进行检测。使用细菌16S rRNA基因V3~V4区通用引物338F和806R对样本进行PCR扩增,将同一样本的PCR产物混合后进行2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)回

收PCR产物。回收的PCR产物经Tris-HCl洗脱后进行2%琼脂糖电泳检测,然后用于冰密封后送到上海美吉生物制药科技有限公司进行Miseq文库构建及测序。

1.3 3种牛瘤胃微生物的生物信息学分析

将Miseq测序后所得到的PE reads用FLASH(<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml>)软件按照overlap关系进行拼接,并使用Fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>)软件对序列进行质控、筛选,依据序列两端的barcode和引物对样品进行识别,并对序列的方向作出相应的调整。使用Usearch(version 7.0, <http://www.drive5.com/usearch/>)软件平台,对序列进行筛选及操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)统计,按97%的相似性进行聚类,随后利用RDP Classifier贝叶斯算法(version 2.11, <https://sourceforge.net/projects/rdpclassifier>)和Silva 16S rRNA数据库对序列进行分类加注,并在各分类水平上对样本的群落组成进行分析。用Mothur(version 1.30.2, <https://www.mothur.org/wiki/>)软件进行Alpha多样性分析,根据Beta多样性距离矩阵进行层级聚类(Hierarchical clustering)分析,使用非加权组平均法(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)构建树状结构,可视化呈现不同样本中群落组成的相似或差异程度。利用Tax4Fun对3种牛瘤胃液中菌落的16S rRNA基因序列进行KEGG功能注释,获得OTU在KEGG各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。

1.4 数据分析

测序数据在美吉生物信息云平台进行分析和分析,对Alpha多样性、门和属及OTU分类水平的菌群相对丰度进行两组间Wilcoxon秩和检验,对富集到的KEGG通路的功能丰度进行单因素方差分析(One-way ANOVA),通过主坐标分析(Principal co-ordinates analysis, PCoA)对组间群落结构进行可视化。

2 结果与分析

2.1 试验牛瘤胃微生物多样性测序分析

2.1.1 基本信息统计 18个样本测序数据经过拼接、过滤和嵌合体丢弃处理后,共获得了1 181 253条优化序列。采用RDP classifier贝叶斯算法,对OTU代表序列以97%相似水平进行分类分析,18

个样本中的微生物菌群分属 21 个门,42 个纲,88 个目,148 个科,303 个属,593 个种,共有 2 548 个 OTUs。

2.1.2 稀释曲线分析 稀释曲线分析是对序列进行随机抽样,以抽取的序列数与它们对应的物种(如 OTU)数目或多样性指数构建稀释曲线,根据曲线是否随着物种数量的增大而逐渐趋于平缓,来判断本次测序数据量是否足够。本试验用 Sobs(表征实际观测到的物种数量)指数作图,如图 1 所示,18 个样本稀释曲线均逐渐趋于平缓,说明测序数量充足。

2.1.3 微生物群落 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性常用的指数有丰富度指数(超 1 指数(Chao1)、基于丰度的覆盖估计值(ACE))、多样性指数(辛普森指数(Simpson)、香农指数(Shannon))及覆盖度指数(Coverage)等。由表 1 可知,犏牛瘤胃微生物群落超 1 指数、基于丰度的覆盖估计值与香农指数显著高于黄牛和娟姗牛(娟姗牛超1指数除外),覆

盖度指数与黄牛差异显著($P<0.05$),与娟姗牛差异不显著($P>0.05$);3 种牛辛普森指数指数无显著差异。

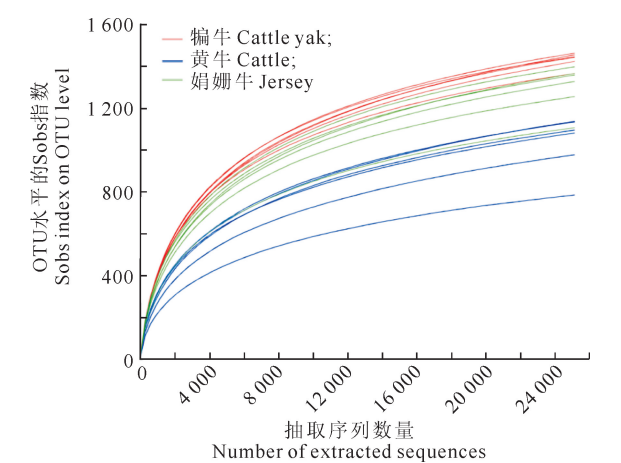


图 1 3 种牛 18 个样本的稀释曲线

Fig. 1 Dilution curves of 18 samples from 3 cattle species

表 1 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物 Alpha 多样性分析

Table 1 Analysis of rumen microbial Alpha diversity of Cattle yak,Cattle and Jersey

牛种 Breed of cattle	超 1 指数 Chao1	基于丰度的覆盖估计值 ACE	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖度指数 Coverage
犏牛 Cattle yak	1 709.000±66.500 a	1 690.000±5.700 a	5.867±0.046 a	0.009±0.001	0.987±0.001 b
黄牛 Cattle	1 320.000±161.900 b	1 305.000±161.000 b	5.155±0.392 b	0.021±0.019	0.989±0.001 a
娟姗牛 Jersey	1 581.000±128.700 a	1 558.000±122.000 c	5.655±0.226 c	0.012±0.004	0.988±0.001 ab

注:数据进行两组间 Wilcoxon 秩和检验。同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Wilcoxon rank sum test was used to analyse the data between the two groups. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.1.4 瘤胃微生物群落门分类水平上的比较分析 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物门水平群落分布结果见图 2。

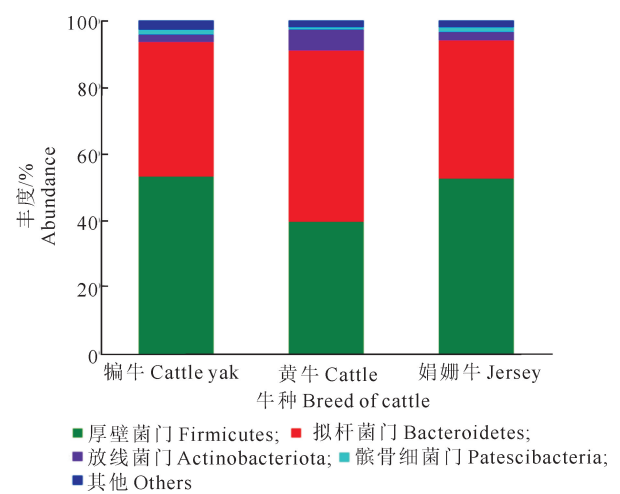


图 2 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物门水平群落分布
Fig.2 Rumen microbial community distribution at phylum level of Cattle yak,Cattle and Jersey

由图 2 可知,3 种牛瘤胃的优势菌门(相对丰度

大于 1%)均为厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门,其在犏牛样本中的丰度依次为 53.26%,40.26%和 2.35%,在黄牛样本中的丰度为 39.70%,51.28%和 6.38%,在娟姗牛样本中的丰度为 52.63%,41.38%和 2.63%;在犏牛和娟姗牛中,髌骨细菌门的丰度也大于 1%,分别为 1.31%和 1.37%。对丰度排在前十的菌种进行组间 Wilcoxon 秩和检验,结果存在差异的物种见表 2。由表 2 可知,犏牛瘤胃中厚壁菌门、脱硫杆菌门、疣微菌门、髌骨细菌门、纤维杆菌门和浮霉菌门丰度显著高于黄牛($P<0.05$),脱硫杆菌门和疣微菌门丰度显著高于娟姗牛($P<0.05$);娟姗牛瘤胃中厚壁菌门和髌骨细菌门丰度显著高于黄牛($P<0.05$)。

2.1.5 瘤胃微生物群落属分类水平上的比较分析 由图 3 可知,在属分类水平上,犏牛优势菌群(相对丰度大于 1%)由理研菌科_RC9 菌群(12.25%)、普雷沃菌属(10.90%)、克里斯氏菌科_R-7 菌群(6.84%)和瘤胃菌科_NK4A214 菌群(6.56%)等菌群组成,黄牛优势菌群由普雷沃菌属(33.17%)、双

歧杆菌属(5.59%)、理研菌科_RC9 菌群(5.05%)和克里斯氏菌科_R-7 菌群(3.53%)等组成,娟珊牛由普雷沃菌属(17.23%)、理研菌科_RC9 菌群(8.87%)、克里斯氏菌科_R-7 菌群(7.17%)和瘤胃菌科_NK4A214 菌群(5.54%)等组成。对丰度处于前 20 的菌种进行组间 Wilcox 秩和检验,结果存在差异的物种见表 3。由表 3 可知,犏牛瘤胃中普雷沃菌属、瘤胃球菌属和解琥珀酸菌属相对丰度显著

低于黄牛($P<0.05$),理研菌科_RC9 菌群丰度显著高于黄牛($P<0.05$);犏牛和娟珊牛瘤胃中克里斯氏菌科_R-7 菌群、瘤胃菌科_NK4A214 菌群、g_norank_f_UCG-011 和未分类毛螺菌科丰度显著高于黄牛($P<0.05$),双歧杆菌属丰度显著低于黄牛($P<0.05$);娟珊牛毛螺菌科_NK3A20 菌群丰度显著高于犏牛和黄牛($P<0.05$)。

表 2 犏牛、黄牛和娟珊牛瘤胃微生物门水平丰度分析

Table 2 Abundance of rumen microbiota at phylum level of Cattle yak,Cattle and Jersey				%
菌群种类 Microbial species	犏牛 Cattle yak	黄牛 Cattle	娟珊牛 Jersey	
厚壁菌门 Firmicutes	53.260±3.770 a	39.700±6.807 b	52.630±7.710 a	
脱硫杆菌门 Desulfobacterota	0.613±0.150 a	0.250±0.125 b	0.361±0.130 b	
疣微菌门 Verrucomicrobiota	0.384±0.140 a	0.101±0.096 b	0.181±0.155 b	
酸骨细菌门 Patescibacteria	1.366±0.55 a	0.610±0.310 b	1.310±0.504 a	
纤维杆菌门 Fibrobacterota	0.109±0.050 a	0.036±0.030 b	0.080±0.064 ab	
浮霉菌门 Planctomycetota	0.010±0.050 a	0.003±0.003 b	0.008±0.014 ab	

注:数据进行两组间 Wilcox 秩和检验。同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下表同。
Note:Data were analyzed by Wilcox rank sum test between the two groups. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below.

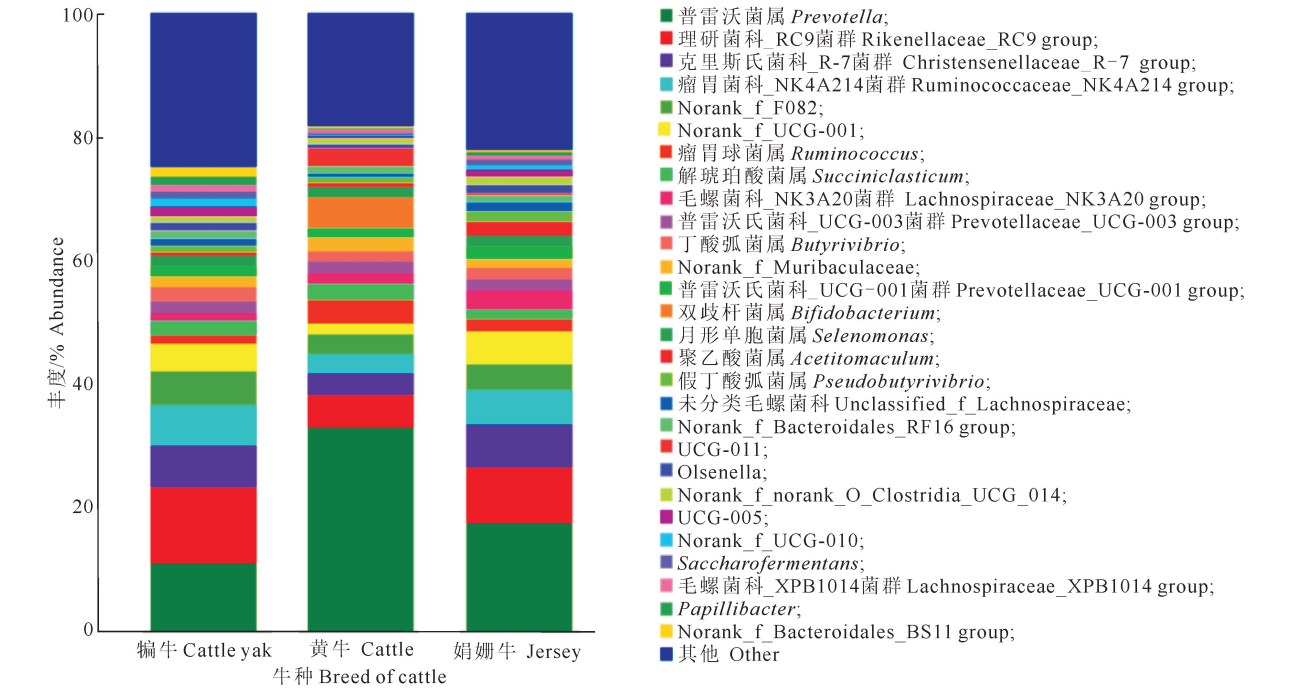


图 3 犏牛、黄牛和娟珊牛瘤胃微生物属水平群落分布

Fig. 3 Rumen microbial community distribution at genus level of Cattle yak,Cattle and Jersey

2.1.6 瘤胃微生物群落 OTU 分类水平上的比较分析 Heatmap 图是用颜色梯度来表明二维矩阵中 OTU 分类水平上的物种丰度大小,并根据物种或样本间丰度的相似性聚类。利用 R 语言(version 3.3.1)vegan 包对 OTU 分类水平丰度处于前 25 的物种进行相似性聚类,结果见图 4。由图 4 可知,犏牛和娟珊牛间 OTU 丰度相似较高;对图 4 中的

OTUs 进行组间 Wilcox 秩和检验,结果有差异的 OTUs 见表 4。由表 4 可知,犏牛和娟珊牛瘤胃中 OTU526、OTU1517、OTU1352 和 OTU81 的丰度显著高于黄牛(娟珊牛 OTU1352 除外),黄牛 OTU612、OTU2263、OTU1013、OTU111、OTU487 和 OTU829 的丰度显著高于犏牛和娟珊牛($P<0.05$)。

表 3 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物属水平丰度分析

Table 3 Abundance of rumen microbiota at genus level of Cattle yak,Cattle and Jersey %

物种名称 Species name	犏牛 Cattle yak	黄牛 Cattle	娟姗牛 Jersey
普雷沃菌属 <i>Prevotella</i>	10.900±4.933 b	33.170±14.730 a	17.500±8.498 ab
理研菌科_RC9 菌群 Rikenellaceae_RC9 group	12.250±2.829 a	5.230±2.593 b	8.890±3.534 ab
克里斯菌科_R-7 菌群 Christensenellaceae_R-7 group	6.860±0.818 a	3.580±1.101 b	7.080±1.964 a
瘤胃菌科_NK4A214 菌群 Ruminococcaceae_NK4A214 group	6.549±1.251 a	3.070±0.918 b	5.560±1.730 a
g_norank_f_UCG-011	4.415±1.170 a	1.670±0.329 b	5.310±1.927 a
瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	1.402±0.276 b	3.880±1.757 a	2.010±1.722 ab
解琥珀酸菌属 <i>Succiniclasticum</i>	2.306±0.863 b	2.600±1.137 a	1.530±0.968 ab
毛螺菌科_NK3A20 菌群 Lachnospiraceae_NK3A20 group	1.180±0.360 b	1.660±1.061 b	3.080±1.731 a
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	0.000 b	5.100±8.784 a	0.000 b
未分类毛螺菌科 Unclassified_f_Lachnospiraceae	1.242±0.144 a	0.690±0.260 b	1.550±0.687 a

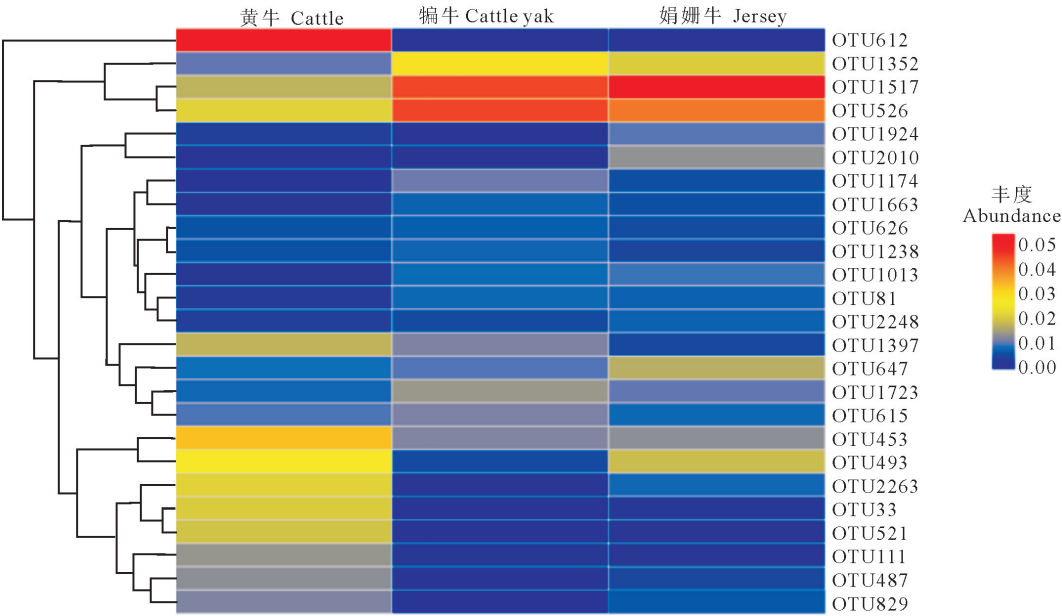


图 4 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物 OTU 水平群落分布

Fig. 4 Rumen microbial community distribution at OTU level of Cattle yak,Cattle and Jersey

表 4 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物 OTU 水平丰度分析

Table 4 Abundance of rumen microbiota at OTU level of Cattle yak,Cattle and Jersey %

物种名称 Species name	犏牛 Cattle yak	黄牛 Cattle	娟姗牛 Jersey
OTU526	4.444±0.888 a	2.112±0.613 b	3.998±1.233 a
OTU1517	4.436±1.139 a	1.711±0.386 b	5.326±1.935 a
OTU612	0.000 b	5.008±8.686 a	0.001±0.002 b
OTU1352	2.838±0.997 a	1.036±0.826 b	2.048±1.375 ab
OTU2263	0.192±0.125 b	2.113±1.019 a	0.795±0.539 b
OTU1013	0.039±0.018 b	2.021±2.031 a	0.313±0.300 b
OTU111	0.263±0.314 b	1.363±0.985 a	0.215±0.228 b
OTU487	0.184±0.058 b	1.295±0.782 a	0.543±0.474 b
OTU81	0.808±0.248 a	0.399±0.114 b	0.747±0.390 a
OTU829	0.023±0.016 b	1.179±0.812 a	0.669±1.665 b

2.1.7 瘤胃微生物 Beta 多样性分析 在 OTU 分类水平上对各样本建立层级聚类树,分析不同样本菌群的组间类似性和差异关系。由图 5 可知,犏牛

和娟姗牛瘤胃菌群结构组成相似,二者和黄牛瘤胃菌群结构组成差异较大。

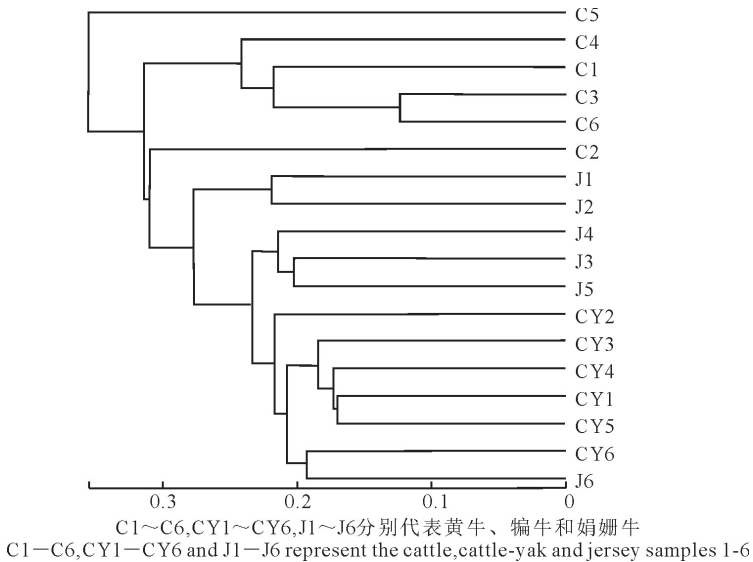


图 5 犏牛、黄牛和娟姗牛 18 个样本 OTU 层级聚类分析

Fig. 5 OTU hierarchical clustering analysis of 18 samples from Cattle yak,Cattle and Jersey

PCoA 分析是一种非约束性的数据降维分析方法,用来研究样本群落组成的相似性或差异性,使用 R 语言(version 3. 3. 1)PCoA 统计分析和作图。由图 6 可以看出,犏牛和娟姗牛瘤胃内细菌群落组成较相似,二者与黄牛间差异较大。

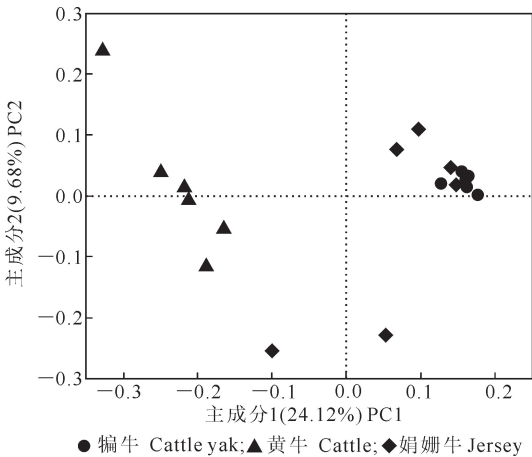


图 6 犏牛、黄牛和娟姗牛 18 个样本群落组成相似性分析
Fig. 6 Community composition similarity analysis of 18 samples from Cattle yak,Cattle and Jersey

2.2 瘤胃菌群功能丰度 KEGG 通路对比分析

犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃菌群功能丰度 KEGG 通路分析结果见表 5。由表 5 可知,3 种牛瘤胃菌群功能丰度富集在前 10 条的一、二级通路依次为环境信息处理通路下的膜运输和信号传导、遗传信息处理通路下的翻译、复制和修复及新陈代谢通路下的碳水化合物代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、能量代谢、聚糖的生物合成与代谢。对二级通路进行单因素方差分析,发现犏牛富集在碳水化合物代谢、核苷酸代谢和翻译二级通路的功能丰度显著高于黄牛($P<0.05$),但与娟姗牛差异不显著($P>0.05$);富集在能量代谢和膜运输二级通路的功能丰度显著高于黄牛和娟姗牛($P<0.05$)。黄牛富集在辅助因子和维生素的代谢二级通路的功能丰度显著高于犏牛和娟姗牛($P<0.05$),富集在信号传导和聚糖的生物合成与代谢通路的功能丰度显著高于犏牛($P<0.05$)。氨基酸代谢、复制和修复通路的功能丰度在 3 种牛之间差异不显著($P>0.05$)。

表 5 犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃菌群功能丰度 KEGG 通路分析

Table 5 Functional KEGG pathway analysis of rumen microbiota in Cattle yak,Cattle and Jersey

一级通路 Pathway level 1	二级通路 Pathway level 2	KEGG 二级通路功能丰度 KEGG pathway level 2 functional abundance		
		犏牛 Cattle yak	黄牛 Cattle	娟姗牛 Jersey
环境信息处理 Environmental information processing	膜运输 Membrane transport	0.146±0.005 a	0.136±0.005 b	0.138±0.008 b
	信号传导 Signal transduction	0.045±0.002 b	0.049±0.002 a	0.048±0.003 ab
遗传信息处理 Genetic information processing	翻译 Translation	0.075±0.002 a	0.068±0.004 b	0.714±0.005 ab
	复制和修复 Replication and repair	0.065±0.016 a	0.062±0.002 a	0.062±0.003 a

表 5(续) Continued table 5

一级通路 Pathway level 1	二级通路 Pathway level 2	KEGG 二级通路功能丰度 KEGG pathway level 2 functional abundance		
		犏牛 Cattle yak	黄牛 Cattle	娟珊牛 Jersey
新陈代谢 Metabolism	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	0.147±0.004 a	0.145±0.005 b	0.146±0.004 a
	氨基酸代谢 Amino acid metabolism	0.101±0.004 a	0.104±0.003 a	0.105±0.005 a
	核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	0.078±0.002 a	0.072±0.003 b	0.075±0.004 ab
	辅助因子和维生素的代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	0.055±0.003 b	0.066±0.006 a	0.058±0.005 b
	能量代谢 Energy metabolism	0.044±0.003 a	0.039±0.001 b	0.040±0.003 b
	聚糖的生物合成与代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	0.044±0.003 b	0.052±0.004 a	0.047±0.005 ab

3 讨 论

瘤胃微生物群落在维持反刍动物正常消化功能和健康等方面发挥着重要作用,研究瘤胃微生物在不同品种间的差异具有重要意义^[5]。本研究发现,犏牛、黄牛和娟珊牛瘤胃菌群优势菌门均为厚壁菌门、拟杆菌门,这与前人对湘西黄牛^[21]、安格斯与西门塔尔杂交牛^[22]的研究结果一致。Hook 等^[23]研究发现,厚壁菌门中包含多种降解纤维素的菌种。Hess 等^[24]发现,拟杆菌门主要降解非纤维碳水化合物,其不能产生纤维素降解酶,需与厚壁菌门协作才能消化瘤胃中的木质纤维素和蛋白质等^[25]。饲料会改变瘤胃微生物菌群结构^[26],在长期采食高纤维饲草的条件下,犏牛、黄牛和娟珊牛瘤胃中降解粗纤维的菌群增多,犏牛瘤胃中具有粗纤维降解能力的厚壁菌门、纤维杆菌门菌群丰度高于黄牛,娟珊牛瘤胃中厚壁菌门的丰度高于黄牛。Sonnenburg 等^[27]报道,反刍动物采食高纤维饲料会引起瘤胃内微生物多样性升高。本研究微生物多样性分析表明,犏牛瘤胃微生物多样性和丰富度高于黄牛和娟珊牛,据此推测犏牛的纤维素消化能力可能更强。另有研究表明,胃肠道中丰富的微生物群落有利用肌肉生长与脂肪沉积^[28]。刘鲲鹏等^[29]研究发现,犏牛肉品质各项指标都优于黄牛,产生这一结果的原因与犏牛瘤胃菌群有关。

普雷沃氏菌属属于拟杆菌门,在瘤胃中主要降解淀粉和植物细胞壁多糖,产生短链脂肪酸^[30]。Gharechahi 等^[31]研究表明,普雷沃氏菌属需与纤维降解菌协作才能分解利用植物纤维素中的果胶等多糖。解琥珀酸菌属可以降解纤维产生琥珀酸和乙酸等物质^[32]。本研究中,黄牛瘤胃中普雷沃氏菌属和解琥珀酸菌属丰度高于犏牛,这提示黄牛可能在非纤维碳水化合物的利用、乙酸合成方面更具优势。犏牛和娟珊牛瘤胃中理研菌科_RC9 菌群、克里斯氏菌科_R-7 菌群、瘤胃菌科_NK4A214 菌群的丰度

高于黄牛(娟珊牛理研菌科_RC9 菌群除外),其中犏牛瘤胃优势菌群与戴东文等^[33]对放牧牦牛的研究结果基本一致,但娟珊牛瘤胃优势菌群与 Iqbal 等^[18]的研究结果不一致,原因可能与饲养条件不同有关。理研菌科_RC9 菌群在瘤胃中的主要作用是对糖类或蛋白质进行降解^[34];瘤胃菌科_NK4A214 菌群隶属于厚壁菌门,能够分泌纤维素降解酶分解粗纤维并产生乙酸^[35];克里斯氏菌科_R-7 菌群对维持胃肠道功能具有重要作用^[36]。本研究犏牛瘤胃中与纤维素分解、蛋白质降解相关的菌群丰度高于其他 2 种牛,这与 Zhang 等^[15]的研究结果基本一致,犏牛作为高原反刍动物其瘤胃菌群发酵模式可能更有利于机体在极端环境中生存。

品种对瘤胃菌群组成也有很大影响^[3],同等舍饲条件下,高海拔地区犏牛的饲料转化率和生长速度高于黄牛和牦牛^[13];赵聪聪^[37]研究表明,冬季高原放牧条件下黄牛、犏牛和牦牛瘤胃液细菌、原虫等微生物都有显著差异,犏牛瘤胃细菌丰富度高于黄牛和牦牛,犏牛和黄牛瘤胃菌群 Alpha 多样性与本研究结果基本一致,但细菌菌群组成和丰度与本研究结果存在差异。张瑜等^[38]报道,同等饲养条件下努比亚山羊瘤胃中拟杆菌门和普氏菌属菌群丰度均高于都安山羊,这可能是努比亚山羊耐粗饲的原因。Huang 等^[16]对高海拔与低海拔绵羊瘤胃菌群进行 16S rRNA 测序分析,发现高海拔绵羊瘤胃微生物多样性显著高于低海拔绵羊,这可能是绵羊为适应高海拔环境长期进化的结果。Xin 等^[39]对 3 个高海拔地区的牦牛与低海拔地区黄牛、奶牛的瘤胃菌群进行了比较分析,发现各组间菌群多样性差异显著。诸多研究表明,品种会影响瘤胃菌群组成,本研究中 3 种牛瘤胃菌群丰度与多样性存在显著差异,表明 3 种动物瘤胃菌群可能发生了适应性变化。

瘤胃微生物可以把饲料中的纤维素和戊聚糖分解成 VFA^[40-41],反刍动物 70%~80% 的能量来源于 VFA^[42]。因此对瘤胃微生物功能的探究至关重

要。本研究犏牛瘤胃菌群富集在碳水化合物代谢、核苷酸代谢和翻译二级通路的功能丰度高于黄牛,与娟姗牛无差异;富集在能量代谢和膜运输二级通路的功能丰度高于黄牛和娟姗牛;黄牛富集在信号传导和聚糖的生物合成与代谢通路的功能丰度高于犏牛和娟姗牛。功能丰度分析表明,犏牛、黄牛和娟姗牛瘤胃微生物在新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理等方面存在差异,其中犏牛代谢通路中碳水化合物代谢功能丰度富集量最大,表明犏牛瘤胃内可能会产生大量纤维素降解酶,降解利用纤维素、半纤维素和木质素等非淀粉多糖,对粗纤维的利用效率较高。

4 结 论

3 种牛中以犏牛瘤胃内菌群多样性和丰富度最具优势,其与黄牛的微生物组成和功能差异较大;娟姗牛瘤胃菌群丰度介于犏牛和黄牛之间。犏牛瘤胃中丰富的菌群可能为其适应高原地区严酷的生存环境发挥了重要作用。

[参考文献]

[1] Seshadri R, Leahy S C, Attwood G T, et al. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 collection [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 359-367.

[2] McCann J C, Wickersham T A, Loor J J. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism [J]. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2014, 8: 109-125.

[3] Li F Y, Hitch T C A, Chen Y H, et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle [J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 6.

[4] 徐 琴. 饲料和品种对山羊瘤胃微生物多样性的影响 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2015.

Xu Q. The impact of ration and goat breeds on the composition and the relative abundance of microbial species in goat rumen [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2015.

[5] 刘旺景. 反刍动物瘤胃微生物菌群及其影响因素的研究进展 [J]. *饲料工业*, 2022, 43(3): 50-56.

Liu W J. Research advances of rumen microbiome flora and its influencing factors in ruminants [J]. *Feed Industry*, 2022, 43(3): 50-56.

[6] Andersen T O, Kunath B J, Hagen L H, et al. Rumen metaproteomics: closer to linking rumen microbial function to animal productivity traits [J]. *Methods*, 2021, 186: 42-51.

[7] Sirohi S K, Chaudhary P P, Singh N, et al. The 16S rRNA and *mcrA* gene based comparative diversity of methanogens in cat-

tle fed on high fibre based diet [J]. *Gene*, 2013, 523(2): 161-166.

[8] Gharechahi J, Vahidi M F, Bahram M, et al. Metagenomic analysis reveals a dynamic microbiome with diversified adaptive functions to utilize high lignocellulosic forages in the cattle rumen [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(4): 1108-1120.

[9] Sbardellati D L, Fischer A, Cox M S, et al. The bovine epimural microbiota displays compositional and structural heterogeneity across different ruminal locations [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(4): 3636-3647.

[10] Ozbayram E G, Ince O, Ince B, et al. Comparison of rumen and manure microbiomes and implications for the inoculation of anaerobic digesters [J]. *Microorganisms*, 2018, 6(1): 15-25.

[11] 吴周林, 左 玲, 徐弘扬, 等. 犏牛杂种优势研究进展 [J]. *当代畜牧*, 2018(6): 23-25.

Wu Z L, Zuo L, Xu H Y, et al. The research progress on heterosis in cattle-yak [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2018(6): 23-25.

[12] 罗晓林, 谢荣清, 徐惊涛, 等. 青藏高原犏牛生产技术与示范 [J]. *草业与畜牧*, 2009(1): 1-4.

Luo X L, Xie R Q, Xu J T, et al. Review of research and demonstration of cattle-yak industrialization in Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Prataculture & Animal Husbandry*, 2009(1): 1-4.

[13] 官久强, 杨平贵, 蒋小兵, 等. 半农半牧区舍饲牦牛、犏牛的短期育肥效益分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(18): 79-81.

Guan J Q, Yang P G, Jiang X B, et al. Short term fattening benefit analysis of yak and cattle-yak in semi-agricultural and semi-pastoral areas [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(18): 79-81.

[14] 官久强, 张海波, 罗晓林. 舍饲牦牛与犏牛生长性能、屠宰性能、肉品质和肌肉脂肪沉积相关基因表达的比较分析 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(6): 2659-2665.

Guan J Q, Zhang H B, Luo X L. Comparative study on growth performance, slaughter performance, meat quality and intramuscular fat deposition related gene expression between dzo and yak in house feeding [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(6): 2659-2665.

[15] Zhang Z G, Xu D M, Wang L, et al. Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals [J]. *Current Biology*, 2016, 26(14): 1873-1879.

[16] Huang J Q, Li Y J, Luo Y Z. Bacterial community in the rumen of Tibetan sheep and Gansu alpine fine-wool sheep grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau, China [J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2017, 63(2): 122-130.

[17] Paul S S, Dey A, Baro D, et al. Comparative community structure of Archaea in rumen of buffaloes and cattle [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(10): 3284-3293.

[18] Iqbal M W, Zhang Q, Yang Y, et al. Comparative study of rumen fermentation and microbial community differences be-

- tween water buffalo and Jersey cows under similar feeding conditions [J]. Journal of Applied Animal Research, 2018, 46(1): 740-748.
- [19] Ishaq S L, Wright A D. High-throughput DNA sequencing of the ruminal bacteria from moose (*Alces alces*) in Vermont, Alaska, and Norway [J]. Microbial Ecology, 2014, 68(2): 185-195.
- [20] Wang Y Y, Cao P H, Wang L, et al. Bacterial community diversity associated with different levels of dietary nutrition in the rumen of sheep [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(9): 3717-3728.
- [21] Li Y D, Ma S, Zhang X J, et al. Evaluation of bacterial and archaeal diversity in the rumen of Xiangxi yellow cattle (*Bos taurus*) fed *Miscanthus sinensis* or common mixed feedstuff [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(3): 1385-1394.
- [22] Brulc J M. Comparative gene-centric metagenomics of the rumen microbiome. [D]. Urbana-Champaign: University of Illinois at Urbana-Champaign, 2009.
- [23] Hook S E, Steele M A, Northwood K S, et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 78(2): 275-284.
- [24] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. Science, 2011, 331(6016): 463-467.
- [25] Huo W J, Zhu W Y, Mao S Y. Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and solid-associated bacteria in the rumen of goats [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(2): 669-680.
- [26] Omoniyi L A, Jewell K A, Isah O A, et al. An analysis of the ruminal bacterial microbiota in West African Dwarf sheep fed grass-and tree-based diets [J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(5): 1094-1105.
- [27] Sonnenburg J L, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. Nature, 2016, 535(7610): 56-64.
- [28] 吴敏, 刘作华, 齐仁立. 肠道微生物调控动物肌肉的生长和发育 [J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 3976-3982.
- Wu M, Liu Z H, Qi R L. Intestinal microorganism regulates muscle growth and development in animals [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(9): 3976-3982.
- [29] 刘鲲鹏, 布仁朝格图, 杨嘉蒙, 等. 青海牦牛、犏牛、黄牛体尺测定与改良选育 [J]. 中国牛业科学, 2016, 42(6): 17-20, 24.
- Liu K P, Buren C G T, Yang J M, et al. Body measurements and improvement breeding of Qinghai's yak, cattle-yak and cattle [J]. China Cattle Science, 2016, 42(6): 17-20, 24.
- [30] Kabel M A, Yeoman C J, Han Y J, et al. Biochemical characterization and relative expression levels of multiple carbohydrate esterases of the xylanolytic rumen bacterium *Prevotella ruminicola* 23 grown on an ester-enriched substrate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(16): 5671-5681.
- [31] Gharechahi J, Zahiri H S, Noghabi K A, et al. In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(1): 67-76.
- [32] Koike S, Kobayashi Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(1): 131-138.
- [33] 戴东文, 庞凯悦, 王迅, 等. 精料补饲水平对暖季放牧牦牛瘤胃发酵和菌群结构的影响 [J]. 草业学报, 2022, 31(5): 169-177.
- Dai D W, Pang K Y, Wang X, et al. Effects of different concentrate supplement levels on rumen fermentation and microbial community structure of grazing yaks in the warm season [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(5): 169-177.
- [34] 张年, 杨前平, 陶虎, 等. 枯草期放牧东宝黑头羊瘤胃内环境参数及瘤胃细菌多样性分析 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(23): 116-121.
- Zhang N, Yang Q P, Tao H, et al. Analysis on ruminal environment and rumen bacterial diversity of grazing Dongbao blackhead goats in grass withering period [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(23): 116-121.
- [35] 马力, 徐世晓, 刘宏金, 等. 不同物候期牧草对放牧牦牛瘤胃内环境参数及瘤胃微生物多样性的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31(2): 681-691.
- Ma L, Xu S X, Liu H J, et al. Effects of forage grass in different phenological periods on ruminal environment parameters and rumen microbial diversity of free-range yak (*Bos grunniens*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(2): 681-691.
- [36] 刘开朗, 卜登攀, 王加启, 等. 六个不同品种牛的瘤胃微生物群落的比较分析 [J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(1): 13-18.
- Liu K L, Bu D P, Wang J Q, et al. Comparative analysis of rumen microbial communities in six species of cattle [J]. Journal of China Agricultural University, 2009, 14(1): 13-18.
- [37] 赵聪聪. 放牧条件下黄牛、犏牛和牦牛瘤胃液生理生化指标及微生物组成比较研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- Zhao C C. Analysis of physiological and biochemical indexes and microbial composition of rumen liquid of cattle, dzo and yak under grazing conditions [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.
- [38] 张瑜, 张叁保, 申玉建, 等. 2 个品种山羊瘤胃菌群结构比较及其功能预测分析 [J]. 南方农业学报, 2021, 52(5): 1-11.
- Zhang Y, Zhang S B, Shen Y J, et al. Comparison of rumen microbiota structure and functional prediction of two goat breeds [J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(5): 1-11.
- [39] Xin J W, Chai Z X, Zhang C F, et al. Comparing the microbial community in four stomach of dairy cattle, yellow cattle and three yak herds in Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1547.