

不同物候期牧草对藏系绵羊血清生化指标、瘤胃内环境参数及瘤胃微生物功能菌群的影响

刘宏金^{1,2,3} 徐世晓^{1,2*} 韩学平^{1,2,3} 马力^{1,2,3} 胡林勇^{1,2}
赵娜^{1,2} 徐田伟^{1,2} 康生萍^{1,2,3}

(1.中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2.中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810008; 3.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本试验旨在研究不同物候期牧草对藏系绵羊血清生化指标、瘤胃内环境参数及瘤胃微生物功能菌群的影响。分别于高寒草甸返青期、青草期和枯草期采集牧草样品,测定常规营养成分含量。选取体重为(34.08±2.94) kg的10只4岁全年放牧的藏系母绵羊,用耳标进行标记,分别于返青期、青草期和枯草期清晨放牧前空腹进行颈静脉采血及瘤胃液采集,用于分析血清生化指标、瘤胃内环境参数及瘤胃微生物功能菌群。结果表明:1) 青草期牧草粗蛋白质和粗脂肪含量显著高于返青期和枯草期($P<0.05$),而枯草期牧草酸性洗涤纤维含量显著高于其他2个时期($P<0.05$),中性洗涤纤维含量显著高于返青期($P<0.05$)。2) 血清中甘油三酯、低密度脂蛋白和生长激素含量随物候期推移无显著变化($P>0.05$)。枯草期血清总蛋白、白蛋白含量和谷丙转氨酶活性显著低于返青期和青草期($P<0.05$)。3) 藏系绵羊瘤胃液氨态氮、乙酸、异丁酸、戊酸含量及丙酸比例均在青草期最高,乙酸比例在枯草期最高,乙酸/丙酸在枯草期显著高于返青期和青草期($P<0.05$)。4) 宏基因组测序结果表明,放牧藏系绵羊瘤胃微生物相对丰度最高的是细菌,约占总微生物含量的70%,其次是真菌(20%),剩余是未注释到的微生物(10%)。其中,瘤胃液中主要纤维素分解菌为栖瘤胃普雷沃氏菌、白色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌,其相对丰度均在枯草期显著高于返青期和青草期($P<0.05$),淀粉分解菌、反刍兽新月单胞杆菌的相对丰度在青草期显著高于其他物候期($P<0.05$)。由此得出,不同物候期牧草营养成分含量变化引起藏系绵羊血清生化指标、瘤胃内环境参数、瘤胃微生物功能菌群的变化;冷季(返青期和枯草期)因血清中总蛋白、白蛋白、球蛋白、葡萄糖及瘤胃挥发性脂肪酸含量低,导致藏系绵羊潜在的抵御疾病能力弱,可利用能量源少,因此在返青期和枯草期应对放牧藏系绵羊进行合理补饲提高藏系绵羊生长性能。

关键词: 物候期;藏系母绵羊;牧草营养成分;血清生化指标;瘤胃内环境参数;瘤胃功能菌群

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)03-1396-09

藏系绵羊是青藏高原重要的畜种,是当地牧民赖以生存的草食家畜。高原牧区藏系绵羊全年放牧是牧民千百年来形成的传统,尽管暖牧冷饲

的“两段式”饲养模式^[1-2]逐渐被越来越多的农牧民接受,但是,大多数的农牧民的饲养方式还是以全年放牧为主。天然牧草作为放牧家畜的主要食

收稿日期:2019-09-19

基金项目:中国科学院战略性先导专项(XDA23060603, XDA20050104);国家重点研发项目(2016YFC0501905, 2016YFC0501805);国家自然科学基金项目(31402120);青海省重点研发与转化项目(2019-NK-118, 2019-SF-149, 2019-SF-153);青海省重大专项项目(2018-NK-A2, 2017-SF-A6);三江源生态保护和建设二期工程科研和推广(2018-S-2)

作者简介:刘宏金(1990—),男,河南南阳人,博士研究生,研究方向为放牧家畜生态学。E-mail: liuhj@nwipb.cas.cn

*通信作者:徐世晓,研究员,博士生导师, E-mail: sxxu@nwipb.cas.cn

物来源,与家畜的生长、代谢、消化及健康状况息息相关。诸多研究发现,性别、品种、年龄、饲料结构都会对反刍动物瘤胃微生物区系产生影响^[3-4],进一步影响瘤胃发酵过程中挥发性脂肪酸和微生物蛋白质的产生,最终影响宿主的生产性能及健康状况。当前研究主要集中在不同的饲养方式对藏系绵羊的影响^[3,5-6],而对于全年放牧家畜的研究鲜有报道。因此,本试验主要研究藏系绵羊在高寒草甸牧草返青期、青草期和枯草期血清生化指标、瘤胃发酵参数及瘤胃微生物功能菌群的变化,旨在为高寒牧区放牧绵羊科学化养殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点及试验设计

试验于2017年4月至2017年12月在青海省贵南县嘉仓生态畜牧业专业合作社进行。该地区属高原大陆性气候,年降水量为403.8 mm,平均海拔为3 300 m,年平均气温为2.3 ℃,牧草生长期120 d左右,一般5月开始发芽,9月开始枯黄,草地类型为高寒草甸。

试验期间,选取体重 $[(34.08 \pm 2.94) \text{ kg}]$ 相近的10只4岁全年放牧的藏系母绵羊,用带有数字的耳标进行标记,在贵南县森多乡高寒草甸(N35°28'~35°41',E100°42'~100°54')进行全年放牧。试验期间动物体况良好、无补饲、自由饮水。

1.2 样品采集及指标测定

1.2.1 采集时间

分别于返青期(5月2日)、青草期(7月12日)、枯草期(12月7日)采集牧草、绵羊血清和瘤胃液样品。其中3个物候期牧草、绵羊血清和瘤胃液的采集均为10个重复。

1.2.2 牧草采集及指标测定

分别将试验样地划分10个样方(0.5 m×0.5 m),采集样方中混合牧草地上生物量,将不可食牧草去除,只保留可食牧草,于烘箱中65 ℃烘至质量恒等,粉碎过筛进行牧草营养成分检测。在风干物质基础上测定牧草营养成分,包括粗蛋白质(CP)^[7]、粗脂肪(EE)^[8]、酸性洗涤纤维(ADF)^[9]和中性洗涤纤维(NDF)^[9]含量。

1.2.3 血样采集及指标检测

清晨放牧前,将试验藏系绵羊侧卧绑定,将采血部位剪毛,用75%的医用酒精消毒,用手按压颈

静脉,待血管膨胀之后刺入一次性采血针头,并用真空非抗凝采血器每只藏羊采血约5 mL。血液采集后,管口向上,垂直放置,期间避免晃动造成溶血。在室温条件下静置30~40 min,待血清析出,3 000 r/min离心15 min,收集血清,于4 ℃车载冰箱保存,带回实验室后,于-80 ℃超低温冰箱保存。血清送至青海省人民医院,用全自动血液分析仪(XN-1000, Sysmex 公司)测定血清生化指标,包括总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)含量及谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性。用绵羊生长激素(GH)酶联免疫吸附试验试剂盒测定样品吸光度(OD)值,每个样品做2个重复,以标准品含量为纵坐标,OD值为横坐标构建Harris标准曲线模型方程,将样品的OD值代入模型方程,计算出样品含量,再乘以稀释倍数,即为样品实际GH含量。

1.2.4 瘤胃液采集及发酵参数检测

分别于清晨放牧前,采用投管法经口腔直接插管进入瘤胃用真空泵进行采样,内容物用三角瓶进行收集并迅速用4层无菌脱脂纱布过滤,每只羊采集瘤胃液67 mL,其中45 mL用50 mL的离心管储存,用来测定氨态氮(NH₃-N)和挥发性脂肪酸(VFAs)含量,另外10 mL装于15 mL离心管中,并立即进行瘤胃液pH测定,剩余瘤胃液置于2 mL冻存管中用来进行DNA的提取和宏基因组检测。瘤胃液pH用雷磁pHSJ-3型(上海仪电科学仪器股份有限公司)pH计测定;NH₃-N含量采用Rhine等^[10]的方法测定;VFAs含量采用安捷伦7890A型气象色谱仪进行测定。其中极性色谱柱规格为30 m×0.25 mm×0.25 μm,色谱柱内装氢离子火焰检测器(FID),升温条件为:60 ℃保持2 min,以10 ℃/min升温速率升温到180 ℃,再以20 ℃/min升温速率升至250 ℃。其他色谱条件:检测器温度为250 ℃;分流比为20:1;流速为1 mL/min;进样口温度为200 ℃。

1.2.5 瘤胃微生物宏基因组DNA提取及建库

每个物候期挑选5个样品,根据耳标号各物候期一一对应,进行总DNA的提取。每个样品解冻约250 mg,采用CTAB法提取基因组DNA,琼脂糖凝胶电泳定量(胶浓度2%,电压120 V,时间30 min),NanoDrop-2000(赛默飞世尔科技,中

国)检测总DNA的纯度和浓度。所有样品OD_{260/280}均在1.8~2.0,DNA条带未见降解。采用NEB文库试剂盒(NEBNext[®] MLtra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina[®],NEB#7370)对纯化后的DNA进行350 bp小片段DNA文库构建,并用Agilent 2100对文库进行浓度、插入片段大小进行检测。

1.2.6 宏基因组测序及分析

对文库采用Illumina HiSeq2500的PE150模式上机测序。采用FastQC(V0.11.5)对原始数据进行质量评估,为获取高质量序列,数据过滤的标准如下:去除含接头的序列;去除N的比例大于10%的序列;去除低质量序列(质量值Q≤20的碱基数占整个read的40%以上)。采用Bowtie2比对到宿主参考基因组,过滤来源于宿主的序列,得到有效序列。采用MEGAHIT(V1.0.6)对整理后的有效序列进行组装,k-mer的范围为21~99,采用BWA对装配好的序列进行评估分析,部分不能比对上参考基因组的序列(unmapped reads),将每个

样本汇集到一起,使用MEGAHIT重新组装,生成混合组装,最终完成基于单个样品的组装及多样品混合组装。采用基于k-mer的MetaOthello分类器进行微生物物种的分类分析。

1.3 统计分析

试验数据用Excel 2013整理,数据以“平均值±标准误”表示。统计分析用R(V3.5.1)进行,采用plyr包中的“ddply”函数进行平均值与标准误的计算,采用“aov”函数进行单因素方差分析,最后采用“TukeyHSD”函数进行组间两两比较确定差异显著性。 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 高寒草甸不同物候期牧草营养成分

由表1可知,青草期牧草的CP和EE含量显著高于返青期和枯草期($P<0.05$),青草期ADF含量显著低于返青期和枯草期($P<0.05$),NDF含量随物候期呈增加趋势,其中返青期显著低于枯草期($P<0.05$)。

表1 不同物候期牧草常规营养含量(风干基础)

Table 1 Common nutrition contents of forage grass in different phenological periods (air-dry basis) %

项目 Items	物候期 Phenological periods			P 值 P-value
	返青期 Regreen period	青草期 Grassy period	枯草期 Withering period	
干物质 DM	94.24±0.33 ^b	94.60±0.30 ^{ab}	95.20±0.25 ^a	0.015
粗蛋白质 CP	6.32±0.50 ^b	12.13±0.36 ^a	5.18±0.14 ^c	<0.001
粗脂肪 EE	0.91±0.03 ^{bc}	1.84±0.14 ^a	0.51±0.14 ^c	<0.001
酸性洗涤纤维 ADF	29.82±0.92 ^b	24.52±0.73 ^c	30.21±0.65 ^a	0.004
中性洗涤纤维 NDF	48.31±1.49 ^b	53.01±1.24 ^{ab}	57.13±1.68 ^a	0.003

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

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

2.2 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊血清生化指标的影响

由表2可知,不同物候期下藏系绵羊血清TG、LDL和GH含量无显著变化($P>0.05$)。青草期藏系绵羊血清GLO、GLU、HDL、TC含量及ALT、AST活性显著高于返青期和枯草期($P<0.05$)。此外,枯草期血清ALB含量和AST活性显著低于其他物候期($P<0.05$)。

2.3 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊瘤胃发酵参数的影响

由表3可知,藏系绵羊瘤胃液pH在青草期时有降低趋势,但各组间并无显著差异($P>0.05$);青草期NH₃-N、总挥发性脂肪酸(TVFA)、乙酸、异丁酸、丁酸、戊酸含量显著高于返青期和枯草期($P<0.05$);在返青期丙酸含量显著低于青草期($P<0.05$);与返青期和青草期相比,枯草期乙酸比例显著增加($P<0.05$),丙酸比例显著降低($P<0.05$),乙酸/丙酸显著增加($P<0.05$);青草期异丁

酸、丁酸含量及戊酸比例显著高于返青期和枯草期($P<0.05$)。

表 2 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊血清生化指标的影响

Table 2 Effects of forage grass in different phenological periods on serum biochemical indexes of natural grazing Tibetan sheep

项目 Items	物候期 Phenological periods			P 值 P-value
	返青期 Regreen period	青草期 Grassy period	枯草期 Withering period	
总蛋白 TP/(g/L)	67.73±2.00 ^a	72.03±1.28 ^a	61.22±1.77 ^b	0.001
白蛋白 ALB/(g/L)	30.64±0.83 ^a	29.82±0.69 ^a	25.52±0.80 ^b	<0.001
球蛋白 GLO/(g/L)	37.09±1.97 ^b	42.20±1.04 ^a	35.70±2.02 ^b	0.041
葡萄糖 GLU/(g/L)	2.91±0.16 ^b	3.48±0.12 ^a	2.39±0.16 ^c	0.005
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	23.71±5.25 ^b	33.00±3.56 ^a	14.70±1.73 ^b	0.003
谷草转氨酶 AST/(U/L)	98.20±5.85 ^c	213.13±9.36 ^a	128.71±11.02 ^b	<0.001
总胆固醇 TC/(mmol/L)	1.43±0.06 ^b	2.03±0.12 ^a	1.79±0.12 ^b	0.007
甘油三酯 TG/(mmol/L)	0.21±0.02	0.21±0.03	0.28±0.02	0.063
高密度脂蛋白 HDL/(mmol/L)	0.80±0.05 ^c	1.37±0.06 ^a	1.04±0.06 ^b	<0.001
低密度脂蛋白 LDL/(mmol/L)	0.41±0.04	0.49±0.05	0.43±0.04	0.450
生长激素 GH/(ng/mL)	27.98±1.46	29.06±1.95	27.95±1.05	0.256

表 3 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊瘤胃发酵参数的影响

Table 3 Effects of forage grass in different phenological periods on rumen fermentation parameters of natural grazing Tibetan sheep

项目 Items	物候期 Phenological periods			P 值 P-value
	返青期 Regreen period	青草期 Grassy period	枯草期 Withering period	
pH	6.55±0.09	6.49±0.04	6.58±0.05	0.519
氨态氮 NH ₃ -N/(mg/dL)	6.82±0.51 ^b	10.90±0.75 ^a	4.15±0.51 ^c	<0.001
乙酸 Acetate/(mmol/L)	30.39±3.01 ^b	41.87±2.39 ^a	38.75±3.22 ^b	0.026
丙酸 Propionate/(mmol/L)	6.20±0.69 ^b	8.69±0.73 ^a	7.27±0.59 ^{ab}	0.046
异丁酸 Isobutyric/(mmol/L)	0.55±0.05 ^b	1.01±0.09 ^a	0.41±0.03 ^b	<0.001
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	3.15±0.37 ^b	5.08±0.64 ^a	3.52±0.33 ^b	0.017
戊酸 Valeric/(mmol/L)	0.29±0.04 ^b	0.49±0.04 ^a	0.25±0.02 ^b	<0.001
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	40.57±4.14 ^b	57.14±3.47 ^a	50.21±4.14 ^b	0.023
乙酸比例 Acetate percentage/%	75.04±0.29 ^b	73.58±0.01 ^c	77.14±0.32 ^a	0.006
丙酸比例 Propionate percentage/%	15.18±0.27 ^a	15.13±0.01 ^a	14.49±0.21 ^b	0.003
异丁酸比例 Isobutyric acid percentage/%	1.36±0.03 ^b	1.78±0.01 ^a	0.84±0.04 ^c	<0.001
丁酸比例 Butyric acid percentage/%	7.71±0.32 ^b	8.64±0.57 ^a	7.02±0.26 ^b	0.038
戊酸比例 Valeric acid percentage/%	0.71±0.03 ^b	0.86±0.05 ^a	0.52±0.01 ^c	<0.001
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	4.95±0.10 ^b	4.54±0.09 ^c	5.34±0.09 ^a	0.017

2.4 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊瘤胃区系及功能菌群的影响

由表 4 可知,在放牧藏系绵羊瘤胃微生物中细菌域是最重要的部分,约占总微生物的 70%,其

次是真菌域,约占总微生物的 20%。此外,部分未能注释到的域(unassigned)归属为未知微生物,约占总微生物的 10%。组间差异性分析结果显示,不同物候期细菌域和真菌域的相对丰度无显著差

异($P>0.05$)。返青期末分类域的相对丰度显著低于青草期和枯草期($P<0.05$)。功能菌群的统计结果显示,枯草期产琥珀酸丝状杆菌和白色瘤胃球菌的相对丰度显著高于返青期和青草期($P<$

0.05), 栖瘤胃普雷沃氏菌的相对丰度在返青期最低,青草期产琥珀酸丝状杆菌的相对丰度显著高于其他 2 个物候期($P<0.05$)。

表 4 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊瘤胃区系及功能菌群的影响

Table 4 Effects of forage grass in different phenological periods on rumen flora and functional flora of natural grazing Tibetan sheep

项目 Items	物候期 Phenological periods			P 值 P-value
	返青期 Regreen period	青草期 Grassy period	枯草期 Withering period	
域 Kingdom				
细菌 Bacteria	70.07±1.27	69.36±5.32	69.70±3.15	0.171
真菌 Fungi	20.88±1.33	20.46±2.17	20.63±1.13	0.463
未分类 Unassigned	9.05±0.16 ^b	10.17±0.22 ^a	9.70±0.09 ^a	0.020
物种 Species				
产琥珀酸丝状杆菌 <i>Fibrobacter succinogenes</i>	0.08±0.01 ^b	0.05±0.00 ^c	0.16±0.01 ^a	<0.001
栖瘤胃普雷沃氏菌 <i>Prevotella ruminicola</i>	3.29±0.22 ^b	4.74±0.50 ^a	5.74±0.22 ^a	0.001
反刍兽新月单胞杆菌 <i>Selenomonas ruminantium</i>	0.62±0.11 ^b	0.97±0.10 ^a	0.31±0.01 ^c	0.001
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>	0.23±0.01 ^b	0.16±0.04 ^c	0.28±0.00 ^a	<0.001

3 讨论

3.1 不同物候期牧草营养成分及其对放牧藏系绵羊瘤胃内环境参数的影响

牧草营养成分是评估天然草场载畜量是否合理的关键因素之一^[11],直接影响放牧绵羊营养状况和生长性能。因此,对天然草地不同物候期牧草营养成分进行检测,对畜牧业发展具有重要的指导意义。许多研究表明,天然草场牧草营养成分随物候期的改变而改变^[12]。自返青期至青草期天然草场牧草营养成分逐渐提高,随季节推移,牧草渐渐枯黄,营养成分也将随之降低,特别是冬、春季牧草产量及营养价值不能满足家畜的生长需求,从而导致掉膘现象发生^[1]。本试验结果表明,牧草 CP 含量在枯草期最低,青草期最高,分别为 12.13% 和 5.18%,这与张盼盼等^[12]研究结果相同。其原因可能是,在青草期水热等气候条件更加适宜牧草的生长及植物体内氨基酸积累,使得牧草 CP 含量增加,随着牧草枯黄,植物木质素及其他结构性碳水化合物含量增加,表现为 ADF 和

NDF 含量增加,细胞内容物减少,导致 CP 含量随之降低。此外,依据任继周^[13]牧草 CP 等级划分(高于 16% 为上等,10%~15% 为中等,小于 10% 为低等),本试验青草期牧草品质属于中等,返青期和枯草期处于下等。Satter 等^[14]研究发现,饲料 CP 含量维持在 13% 时,成年母牛瘤胃中微生物生长量最大。本试验中,青草期牧草 CP 含量维持在 12%~13% 能够保证较高的微生物蛋白质合成,而返青期和枯草期饲草 CP 含量均低于 12%,也进一步说明在返青期和枯草期适量补饲的重要性^[4,15]。

瘤胃液中 pH 及 NH₃-N、VFAs 含量是判定瘤胃发酵的主要指标。其中正常瘤胃液 pH 在 6~7,低于 6 将会诱发酸中毒,过高则不利于瘤胃微生物的生长^[16]。本研究中瘤胃液的 pH 介于 6.4~6.5,均在正常的 pH 阈值范围之内,且不同物候期牧草并没有对藏系绵羊瘤胃 pH 产生显著性影响,但在青草期瘤胃 pH 略低于其他 2 个时期,原因可能是青草期饲草中碳水化合物在瘤胃中的发酵速度增快,瘤胃上表皮对 VFAs 的吸收低于其产生速度,使得 VFAs 在瘤胃液中逐渐积累,最终导致 pH

下降^[17]。NH₃-N 是饲料中蛋白质及非蛋白氮物质降解的最终产物,同时也是微生物合成菌体蛋白的主要氮源,其含量直接影响微生物合成菌体蛋白的数量^[18]。本试验中瘤胃 NH₃-N 含量与牧草中 CP 含量的变化规律一致,表现为青草期>返青期>枯草期,在青草期可降解的蛋白质含量高,瘤胃中可发酵氮含量增加,因此瘤胃中 NH₃-N 含量较高;在枯草期放牧绵羊采食劣质牧草,加上在冷季饲草供应不足,不能满足瘤胃中氮的循环使 NH₃-N 含量处于最低值。此外,瘤胃 NH₃-N 含量的适宜范围为 5~30 mg/dL,如果超出此范围则说明瘤胃 NH₃-N 的利用处于失衡状态^[19]。本研究中,瘤胃 NH₃-N 含量较张盼盼等^[12]研究结果偏低,主要的原因可能是本试验通过口腔采集瘤胃液样品,瘤胃液中可能黏附了少量的唾液,最终导致瘤胃液中 NH₃-N 含量降低。VFAs 是饲草在瘤胃中发酵的最终产物,为宿主提供 70%~80% 的总能,是维持其生命活动及生产所需能量的主要来源^[20]。其中,乙酸的功能是进入三羧酸循环产生 ATP 用于细胞的活动和组织合成,占机体总氧化代谢的 25%~40%^[21]。丙酸是 GLU 合成的重要前体,也是唯一生糖型 VFAs。Liu 等^[4]和 Ellis 等^[22]的研究表明,饲料中粗饲料比例高时,瘤胃中乙酸比例较高,相反精饲料比例高时丙酸比例较高。本试验为天然草场放牧,饲草为粗饲料,故 3 个物候期中乙酸比例均较高,乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸及 TVFA 含量在青草期显著高于其他 2 个时期,原因可能是青草期的牧草品质较高,较高的非结构性碳水化合物使其更容易在瘤胃中降解,形成快速发酵,产生更多的 VFAs。此外,本试验中乙酸/丙酸在青草期显著低于返青期和枯草期,从能量利用效率的角度来说,乙酸/丙酸的降低反映的是饲草转化效率的提升^[4],因此,要保证放牧绵羊的生长性能,尤其是在冷季(返青期和枯草期),应适当进行补饲,供应瘤胃微生物所需营养,降低乙酸/丙酸,进而提高饲草转化效率。

3.2 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊血清生化指标的影响

血清生化指标是反映家畜生理机能及代谢状况的重要指标,也是进行临床诊断医疗的重要依据。血清 TP 是 ALB 和 GLO 的总和,它由肝脏合成,除作为维持血浆渗透压平衡的营养物质载体外,也是机体蛋白质的来源之一,用于受损组织修

补和能量供应^[23]。GLO 是作为血液中的抗体,能够客观地反映机体抵御疾病的能力^[24]。程光民等^[25]研究表明,在不同饲喂条件下,杜寒杂交羊血清中 TP 含量在高精料饲粮组(精粗比为 55:45 和 65:35)显著高于低精料饲粮组(精粗比为 35:65 和 45:55)。本研究得出,放牧藏系绵羊血清中 TP 含量在枯草期显著低于返青期和青草期,表明藏系绵羊在漫长的冷季(枯草期)由于牧草营养水平低及饲草缺乏,致使机体对蛋白质的摄取不足,肝脏合成 TP 减少,最终导致藏系绵羊潜在的抵御疾病能力降低。因此,在冷季藏系绵羊的饲养过程中做好疾病的防治十分必要。血糖即血液中的 GLU,是机体活动所必需的物质,来源于糖异生作用,是衡量机体能量代谢的重要指标^[26]。反刍动物血液中 GLU 产生的 2 个途径为瘤胃中丙酸异生作用和饲草中蛋白质糖氨基酸异生作用。本研究发现,随着物候期的推移,青草期藏系绵羊血清中 GLU 含量显著高于返青期和枯草期,这与郭冬生等^[27]研究结果一致。原因可能是在青草期由于牧草品质的提高,饲草在瘤胃中的发酵趋于丙酸发酵模式,并且较高的饲草蛋白质使得蛋白质加速了糖氨基异生作用,致使血清 GLU 含量升高。胆固醇不仅是生物膜的重要组成部分也是胆汁酸、维生素 D 等生理活性物质合成的原料,其合成部位主要来自于肝脏,合成量占其他组织的 70%~80%。因此当肝脏受损时,胆固醇合成受阻,含量降低。本试验结果发现,藏系绵羊在青草期时血清中的 TC 含量显著高于其他物候期,这说明藏系绵羊在青草期时体脂代谢能力强于其他物候期。GH 是由腺垂体分泌的一种肽类激素,能够促进除神经组织以外的所有组织的生长,目前国内对 GH 的研究大多集中在动物的幼龄阶段,而成年阶段的反刍动物鲜有报导^[28-29]。本研究通过对成年放牧藏系绵羊血清中 GH 含量的研究,发现尽管不同物候期牧草营养成分发生显著变化,但 GH 含量相对稳定,无明显变化,这与闫萍等^[30]对青海环湖牦牛在不同季节血液 GH 含量变化的研究结果一致,而 Sticker 等^[31]的研究表明,马血清中 CH 含量随食入蛋白质的多少而升高或降低,这是否与动物的种类、性别有关,目前尚不清楚,需进一步研究。

3.3 不同物候期牧草对放牧藏系绵羊瘤胃微生物功能菌群的影响

瘤胃对饲草的消化主要依赖于瘤胃中的微生物

物,因此对瘤胃微生物的研究一直是反刍动物营养领域研究中的核心内容。本研究表明,藏系绵羊瘤胃微生物主要是细菌域,为总微生物的70%,其次是真菌域,为总微生物的20%。这与 Dehority^[32] 和冯仰廉^[33] 研究认为瘤胃微生物主要包括细菌、真菌、原虫、噬菌体,其中细菌的数量最大,在宿主的营养、免疫和生理过程中发挥重要作用的结论相一致。反刍动物瘤胃中寄生着十分丰富的纤维素分解菌,其中起主要作用的纤维素分解菌是白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、栖瘤胃普雷沃氏菌和产琥珀酸丝状杆菌^[34]。本研究发现,枯草期藏系绵羊瘤胃中的白色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌的相对丰度显著高于返青期和青草期,这与马力等^[35] 的研究结果一致。这是因为枯草期牧草 NDF 和 ADF 含量增加,导致瘤胃发酵变弱,VFAs 含量降低,加之冷季(枯草期)温度低,藏系绵羊为了维持正常生命代谢所需能量,提高自身纤维素分解菌的相对丰度以抵御环境胁迫。此外,Fondevila 等^[36] 研究发现,栖瘤胃普雷沃氏菌对纤维素的降解均高于白色瘤胃球菌和产琥珀酸丝状杆菌单独作用。本研究发现,不同的物候期,栖瘤胃普雷沃氏菌的相对丰度均高于其他纤维素分解菌,表明藏系绵羊瘤胃中主要的纤维素分解菌为栖瘤胃普雷沃氏菌,藏系绵羊在纤维素分解时可能对此菌的依赖性较高。反刍兽新月单胞杆菌是一种重要的淀粉分解菌,本研究发现,青草期瘤胃中此菌的相对丰度显著高于其他物候期。原因可能与高寒草甸牧草种子形成有关。在青草期,矮嵩草、冷地早熟禾、捶穗披碱草等高寒草甸优势物种已经抽穗,部分种子已经开始包浆^[37-38],此时其淀粉含量增加,更有利于淀粉分解菌的生长繁殖,而在返青期和枯草期由于草地风力较大且牛羊等家畜对牧草的践踏,其种子基本已经脱落,牧草淀粉含量少,因此不利于淀粉分解菌的生长繁殖。

4 结论

① 不同物候期牧草营养成分的改变引起放牧藏系绵羊血清生化指标的变化。在返青期和枯草期,血清中 TP、ALB、GLB 含量及 AST、ALT 活性较低,在此期间由于牧草营养水平低及饲草缺乏,机体对蛋白质的吸收利用能力和潜在的抵御疾病能力较弱。因此,在冷季藏系绵羊的饲养过程中

做好疾病的防治十分必要。

② 牧草营养成分含量的变化引起放牧藏系绵羊瘤胃发酵参数的改变。青草期瘤胃液 TVFA、NH₃-N、乙酸、异丁酸、丁酸、戊酸含量均显著高于返青期和枯草期;随着物候期推移,青草期瘤胃液乙酸/丙酸低于返青期和枯草期,瘤胃以丙酸发酵为主,对饲草的利用效率最高。因此,要保证放牧绵羊的生长性能,尤其是在冷季(返青期、枯草期),应适当进行补饲,供应瘤胃微生物所需营养,提高饲草转化效率。

③ 不同物候期牧草对瘤胃微生物功能菌群产生了影响。放牧藏系绵羊瘤胃液中主要的纤维素分解菌为产琥珀酸丝状杆菌、栖瘤胃普雷沃氏菌、白色瘤胃球菌,淀粉分解菌为反刍兽新月单胞杆菌,其中纤维素分解菌在枯草期相对丰度最高,淀粉分解菌在青草期相对丰度最高。

参考文献:

- [1] 徐田伟,吉汉忠,刘宏金,等.牧归后补饲精料对冷季藏系绵羊生长性能的影响[J].西北农业学报,2016,25(8):1132-1136.
- [2] 赵忠,王安禄,王宝全,等.藏系绵羊冷季补饲时限与措施优化研究[J].中国草食动物,2005,25(2):21-23.
- [3] XUE D, CHEN H, ZHAO X Q, et al. Rumen prokaryotic communities of ruminants under different feeding paradigms on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017, 40(4): 227-236.
- [4] LIU H J, XU T W, XU S X, et al. Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau[J]. PeerJ, 2019, 7(2): e7462.
- [5] 崔晓鹏,侯生珍,王志有,等.补饲日粮不同精粗比对妊娠后期藏母羊生产性能及血清指标的影响[J].饲料工业,2016,37(13):40-44.
- [6] 于忠升,张爱忠,姜宁.不同饲喂模式对绵羊营养物质表观消化率及血液生化指标的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2018(11):59-62.
- [7] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2007:48-50.
- [8] HORWITZ W. Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz [M]. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997, 2010.
- [9] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A.

- Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [10] RHINE E D, MULVANEY R L, PRATT E J, et al. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1998, 62(2): 473-480.
- [11] 孙鹏飞, 崔占鸿, 刘书杰, 等. 三江源区不同季节放牧草场天然牧草营养价值评定及载畜量研究[J]. *草业学报*, 2015, 24(12): 92-101.
- [12] 张盼盼, 薛树媛, 金海, 等. 不同物候期牧草对放牧绵羊瘤胃发酵指标的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(3): 698-704.
- [13] 任继周. *草业科学研究方法*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 128.
- [14] SATTER L D, ROFFLER R E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 1975, 58(8): 1219-1237.
- [15] 王彩莲, 郎侠, 宋淑珍, 等. 冷季补饲对欧拉型藏羊生产性能的影响[J]. *中国草食动物科学*, 2018, 38(6): 24-29.
- [16] NOCEK J E. Bovine acidosis: implications on laminitis[J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(5): 1005-1028.
- [17] 塔娜, 桂荣, 魏日华, 等. 沙地恢复草场放牧绵羊体重及瘤胃发酵参数动态变化[J]. *草业学报*, 2010, 19(5): 45-50.
- [18] 葛婷, 孙巍巍, 朱伟云. 不同水平蛋白质底物对猪结肠微生物体外发酵特性和菌体合成能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(7): 1998-2004.
- [19] 王加启. *反刍动物营养学研究方法*[M]. 北京: 现代教育出版社, 2011.
- [20] MARTIN V H. Challenging the retinal for altering VFA ratios in growing ruminates[J]. *Feed Mix*, 1996, 4(1): 8-12.
- [21] 熊本海, 卢德勋, 张子仪. 瘤胃乙酸与丙酸摩尔比例的改变对瘤胃发酵及血液指标的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(6): 537-543.
- [22] ELLIS J L, DIJKSTRA J, BANNINK A, et al. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(8): 2717-2726.
- [23] BÜHLER C, HAMMON H, ROSSI G L, et al. Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone[J]. *Journal of Animal Science*, 1998, 6(3): 758-765.
- [24] BORG B S, LIBAL G W, WAHLSTROM R C. Tryptophan and threonine requirements of young pigs and their effects on serum calcium, phosphorus and zinc concentrations[J]. *Journal of Animal Science*, 1987, 64(4): 1070-1078.
- [25] 程光民, 徐相亭, 刘洪波. 饲料精粗比对育成期杜寒杂交羊生产性能、血清生化指标及经济效益的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(1): 125-127.
- [26] OBA M, ALLEN M S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(1): 174-183.
- [27] 郭冬生, 彭小兰. 不同精粗比全混合日粮对奶牛产奶性能和牛奶品质的影响[J]. *西南农业学报*, 2011, 24(1): 297-300.
- [28] 刘田, 宫强, 李香子, 等. 6月龄去势对延边黄牛生长性能、血液睾酮及生长激素水平的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 45(10): 2937-2943.
- [29] 王波, 柴建民, 王海超, 等. 蛋白水平对早期断奶双胞胎湖羊公羔营养物质消化与血清指标的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(6): 1170-1179.
- [30] 阎萍, 潘和平. 不同季节牧草营养成分与牦牛血液激素含量变化的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(1): 50-52.
- [31] STICKER L S, THOMPSON D, Jr, FERNANDEZ J M, et al. Dietary protein and (or) energy restriction in mares: plasma growth hormone, IGF- I, prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose, and epinephrine[J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(5): 1424-1432.
- [32] DEHORITY B A. *Rumen microbiology*[M]. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.
- [33] 冯仰廉. *反刍动物营养学*[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [34] MICHALET-DOREAU B, FERNANDEZ I, PEYRON C, et al. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents[J]. *Reproduction Nutrition Development*, 2001, 41(2): 187-194.
- [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.
- [36] FONDEVILA M, DEHORITY B A. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages[J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(3): 678-684.
- [37] 贡旭疆. *中国主要优良栽培草种图鉴*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [38] 杨元武. 高寒草甸矮嵩草 (*Kobresia humilis*) 繁殖对策与移栽试验[D]. 硕士学位论文. 西宁: 青海大学, 2007.

Effects of Forage Grass in Different Phenological Periods on Serum Biochemical Indexes, Ruminal Fermentation Parameters and Rumen Microbial Function Flora of Tibetan Sheep

LIU Hongjin^{1,2,3} XU Shixiao^{1,2*} HAN Xueping^{1,2,3} MA Li^{1,2,3} HU Linyong^{1,2}
ZHAO Na^{1,2} XU Tianwei^{1,2} KANG Shengping^{1,2,3}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. Key Laboratory of Adaption and Evolution of Plateau Biota, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 3. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The aim of this experiment was to study the effects of forage grass in different phenological periods on serum biochemical indexes, ruminal fermentation parameters and rumen microbial function flora of Tibetan sheep. The forage grass were collected and the common nutrition contents were determined during the regreen period, grassy period and withering period, respectively. Ten yearlong range females Tibetan sheep at four years of age with body weight of (34.08±2.94) kg were selected and marked using ear tags with numbers. Before free-range with empty stomach in regreen period, grassy period and withering period, the jugular vein blood and rumen fluids were collected to measure the serum biochemical indexes, ruminal fermentation parameters and rumen microbial function flora, respectively. The results showed as follows: 1) the crude protein and ether extract contents of forage grass in grassy period were significantly higher than those in regreen and withering periods ($P<0.05$), whereas the acid detergent fiber content in withering period was remarkably higher than that in the other periods ($P<0.05$), and natural detergent fiber content was remarkably higher than that in regreen period ($P<0.05$). 2) The serum contents of total protein (TP), albumin (ALB) and alanine transaminase (ALT) activity in withering period were significantly lower than those in regreen and grassy periods ($P<0.05$), whereas no significantly different in the contents of triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) and growth hormone (GH) ($P>0.05$). 3) The ruminal fluid contents of ammonia nitrogen, acetate, isobutyric acid, valeric acid and propionate percentage reached the highest in grassy period, whereas the acetate percentage in withering period was the highest, and the ratio of acetate to propionate was significantly higher than that in regreen and grassy periods ($P<0.05$). 4) Metagenomic analysis showed that bacteria which accounted for about 70% of total microorganisms was the highest in the rumen of Tibetan sheep, followed by fungus (20%) and the other unassigned microorganisms (10%). In addition, the main cellulose decomposition bacteria in rumen fluids were *Prevotellla ruminicola*, *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes* and their relative abundance were significantly higher than those in the other two phenological periods ($P<0.05$), whereas the starch decomposition bacteria of *Selenomonas ruminantium* in grassy period was significantly higher than that in other phenological period ($P<0.05$). In conclusion, the changes of common nutrition of forage grass change the serum biochemical indexes, rumen fermentation parameters and some functional bacteria of Tibetan sheep; the analysis of serum biochemical indexes and rumen fermentation parameters showing that Tibetan sheep have weak resistance to diseases in cold season (regreen and withering periods), therefore, the pastoralists should make reasonable supplementary feeding to Tibetan sheep to improve their growth performance. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(3):1396-1404]

Key words: phenological period; Tibetan sheep; forage grass nutrition; serum biochemical indexes; rumen fermentation parameters; rumen microbial function flora

* Corresponding author, professor, E-mail: sxxu@nwipb.cas.cn

(责任编辑 陈鑫)