



# 放牧藏猪、舍饲藏猪与商品猪粪便真菌群落组成及其与饲料纤维消化的相关性研究

谭占坤<sup>1,2</sup>, 池福敏<sup>3</sup>, 商振达<sup>2</sup>, 商鹏<sup>2</sup>, 刘锁珠<sup>2\*</sup>, 强巴央宗<sup>1,2\*</sup>

1 西藏农牧学院高原生态研究所, 西藏 林芝 860000

2 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000

3 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000

谭占坤, 池福敏, 商振达, 商鹏, 刘锁珠, 强巴央宗. 放牧藏猪、舍饲藏猪与商品猪粪便真菌群落组成及其与饲料纤维消化的相关性研究. 微生物学报, 2022, 62(1): 259–274.

Tan Zhankun, Chi Fumin, Shang Zhenda, Shang Peng, Liu Suozhu, Qiangba Yangzong. Fungal community in the feces of grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and commercial pigs and its interaction with dietary fiber digestion. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 259–274.

**摘要:**【目的】研究饲养在西藏高原的放牧藏猪、舍饲藏猪和商品猪(杜长大猪, DLY 猪)粪便中真菌群落组成的差异性, 获取与饲料粗纤维消化相关的真菌群落。【方法】以饲养在西藏高原的 5 月龄放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪为研究对象, 采用消化试验测定放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪对饲料粗纤维的表观消化率。采集粪便样品利用单分子实时测序技术(SMRT), 测定粪便真菌 ITS 基因全长序列, 分析粪便真菌群落的结构和多样性, 采用 Pearson 相关分析获取饲料粗纤维表观消化率与真菌群落的相关性。【结果】在放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪的粪便样品中共鉴定出了 4 个门、13 个纲、23 个目、39 个科、55 个属、58 个种, 放牧藏猪在各分类水平的分类单元数均显著高于舍饲藏猪与 DLY 猪( $P < 0.05$ )。子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)是优势菌门, 在门水平下, 放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪间无显著差异( $P \geq 0.05$ ), 但在纲、目、科、

**基金项目:** 西藏自治区自然科学基金(XZ202001ZR0024G); 西藏农牧学院与西北农林科技大学联合基金(2452020043); 西藏自治区重点研发计划(XZ202001ZY0039N)

Supported by the Natural Science Foundation of Tibet Autonomous Region (XZ202001ZR0024G), by the Tibet Agricultural and Animal Husbandry University and Northwest Agriculture and Forestry University Joint Project (2452020043) and by the Key Research and Development Project of Tibet Autonomous Region (XZ202001ZY0039N)

\*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-894-5822924; E-mail: QIANGBA Yangzong, qbyz628@126.com, LIU Suozhu, L-szh@163.com

Received: 31 March 2021; Revised: 22 June 2021; Published online: 29 October 2021

属、种水平下，放牧藏猪多个真菌类群相对丰度显著高于舍饲藏猪与 DLY 猪( $P<0.05$ )。放牧藏猪具有更高的菌群丰富度和独有分类操作单元(OTU) ( $P<0.05$ )，通过主坐标分析发现放牧藏猪粪便真菌群落与舍饲藏猪和 DLY 猪之间差距明显。放牧藏猪对饲料粗纤维的表观消化率显著高于舍饲藏猪与 DLY 猪( $P<0.05$ )，Pearson 相关性分析表明，*Phialemonium atrogriseum*、*Phialemonium inflatum*、*Podospora communis* 与饲料粗纤维表观消化率呈显著正相关( $P<0.05$ )。【结论】放牧藏猪具有较强的纤维消化能力，可以从其肠道内鉴定出更丰富的真菌类群并进行深入开发，有利于进一步研究藏猪耐粗饲等优良特性。

关键词：藏猪；商品猪；真菌群落；纤维消化；相关性分析

## Fungal community in the feces of grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and commercial pigs and its interaction with dietary fiber digestion

TAN Zhankun<sup>1,2</sup>, CHI Fumin<sup>3</sup>, SHANG Zhenda<sup>2</sup>, SHANG Peng<sup>2</sup>, LIU Suozhu<sup>2\*</sup>, QIANGBA Yangzong<sup>1,2\*</sup>

1 Research Institute of Tibet Plateau Ecology, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Tibet, China

2 College of Animal Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Tibet, China

3 College of Food Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Tibet, China

**Abstract:** [Objective] This study aimed to investigate the differences in the structure of fungal community in the feces of grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and commercial pigs [Duroc×Landrace×Yorkshire (DLY) pigs, aged 5 months] in the Tibet Plateau and to obtain the fungi associated with the digestion of dietary crude fiber. [Methods] The apparent digestibility of dietary crude fiber of grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs was determined via digestion experiments. The full-length ITS region of fecal fungi was determined by single molecule real-time sequencing technology to analyze the structure and diversity of fungal community. The Pearson correlation analysis was performed between apparent digestibility of dietary crude fiber and fungal community. [Results] A total of 58 fungal species belonging to 4 phyla, 13 classes, 23 orders, 39 families, and 55 genera were identified. At each taxonomic level, the fungal taxa in the feces of grazing Tibetan pigs were more than those of either captive Tibetan pigs or DLY pigs ( $P<0.05$ ). *Ascomycota* and *Basidiomycota* were the dominant phyla, and the fungal abundance at the phylum level had no significant difference among the grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs ( $P\geq 0.05$ ). At the levels of class, order, family, genus, and species, the fungal abundance of grazing Tibetan pigs was significantly higher than that of either captive Tibetan pigs or DLY pigs ( $P<0.05$ ). The grazing Tibetan pigs had the most diverse fungi with unique operational taxonomic units ( $P<0.05$ ). The principal coordinate analysis revealed that grazing Tibetan pigs had different fecal fungi compared with captive Tibetan pigs and DLY pigs ( $P<0.05$ ). The grazing Tibetan pigs had higher apparent digestibility of dietary crude fiber than captive

Tibetan pigs and DLY pigs ( $P<0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that *Phialemonium atrogriseum*, *Phialemonium inflatum*, and *Podospora communis* had a positive correlation with the apparent digestibility of dietary crude fiber ( $P<0.05$ ). [Conclusion] The grazing Tibetan pigs had stronger fiber digestibility than the captive Tibetan pigs and DLY pigs. In the future, we could identify more fungal groups from their gut. This information would be helpful in studying the excellent characteristics of Tibetan pigs, such as their tolerance to roughage.

**Keywords:** Tibetan pigs; commercial pigs; fungal community; fiber digestion; correlation analysis

藏猪作为青藏高原特有的地方型猪种, 广泛分布于西藏东南部、四川甘孜与阿坝、云南迪庆及甘南等地区, 主要生活在高山、峡谷、森林与草地等环境中, 长期的低劣饲养使其形成了耐粗饲与抗病力强等特点<sup>[1]</sup>。藏猪肠道微生物与机体的多项机能密切相关, 如纤维降解、疾病抵抗与环境适应等, 因此大量的研究聚焦在藏猪的肠道微生物特别是肠道细菌上<sup>[2]</sup>。研究发现, 藏猪体内存在大量的纤维降解菌, 通过培养得到了一系列高产纤维素酶的细菌<sup>[3]</sup>; 通过藏猪粪便秘植, 可以增强受体动物的机体抗病力<sup>[4]</sup>。

真菌是一个独立的生物界, 与动物和植物并列, 物种数量仅次于昆虫, 在物质和能量循环中起着重要作用<sup>[5]</sup>。除了聚集大量的细菌外, 藏猪肠道也有一定比例的真菌存在, 子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)<sup>[6]</sup>为优势菌门, 红菇属(*Russula*)、念珠菌属(*Candida*)、*Loreleia* 为优势菌属<sup>[7]</sup>。

不同养殖方式会改变藏猪肠道细菌的结构和多样性<sup>[8]</sup>, 但关于饲养环境对藏猪粪便真菌的影响还鲜有报道。第三代测序技术可以产生生长读长和高精度的序列, 有助于在物种水平上以高分类学分辨率生成基于全长 16S rRNA 基因序列的微生物区系<sup>[9]</sup>。由于大部分肠道真菌不能体外培养<sup>[10]</sup>, 本研究采用单分子实时测序技术(SMRT)测定真菌 ITS 基因全长序列, 初步

了解饲养在西藏高原的放牧藏猪、舍饲藏猪和商品猪(杜长大猪, DLY 猪)粪便中真菌群落的结构与多样性, 从真菌角度初步探索藏猪的耐粗饲特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与饲料

在西藏自治区林芝市典型的放牧养殖基地(巴宜区布久乡)捕获 5 月龄放牧养殖的藏猪阉公猪 10 头(全年放牧不补饲), 在林芝市藏猪养殖场与商品猪养殖场中选取身体健康的 5 月龄舍饲藏猪与 DLY 猪阉公猪各 10 头(猪 30 d 断奶后全程采用无抗的配合饲料饲喂)。试验猪饲喂在西藏农牧学院猪消化代谢室中, 单笼饲喂, 按照猪场常规饲养管理程序管理, 自由采食与饮水。

试验采用单因素实验设计, 设 3 个处理, 分别是放牧藏猪组(GTP)、舍饲藏猪组(CTP)、DLY 猪组(DLY), 每个处理 10 个重复, 每个重复 1 头猪。试验期 15 d, 其中预饲期 10 d, 正式收粪期 5 d。3 个处理均饲喂同一饲料(表 1), 饲料设计参考中国猪饲养标准(2004), 粉料。

### 1.2 粗纤维表观消化率测定

按照本课题组前期方法<sup>[11]</sup>, 在正式收粪期, 每天早中晚各收集 3 次试验猪排出的新鲜粪便, 装入对应编号的样品袋后立即放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存。正式收粪期结束后, 分别将每头猪

表 1 饲料组成与营养水平(风干基础)

Table 1 Dietary composition and nutrient level (air-dry basis)

Ingredients	Content/%	Nutrient level <sup>b</sup>	Content/%
Corn	54.47	Digestible energy/(MJ/kg)	12.98
Wheat bran	8.00	Gross energy/(MJ/kg)	17.34
Soybean oil	5.00	Crude protein	13.04
Soybean meal	6.00	Crude fiber	10.63
Alfalfa	25.00	Calcium	0.38
Limestone	0.10	Total phosphorus	0.28
L-Lys-HCl	0.20	Non-phytate phosphorus	0.19
Premix <sup>a</sup>	0.43	Lysine	0.68
Celite	0.80	Methionine+Cysteine	0.36
Total	100.00	Tryptophan	0.19
		Threonine	0.44

<sup>a</sup>: premix was provided with the following diets per kg: Fe 37.00 mg, Cu 3.00 mg, Mn 2.00 mg, Zn 45.00 mg, I 0.13 mg and Se 0.09 mg; vitamin A 1 900.00 IU, vitamin D 190.00 IU, vitamin E 15.00 mg, vitamin K 0.45 mg, vitamin B<sub>1</sub> 1.00 mg, vitamin B<sub>2</sub> 3.00 mg, vitamin B<sub>6</sub> 1.50 mg, vitamin B<sub>12</sub> 15.00 µg, biotin 0.05 mg, pantothenic acid 10.00 mg, niacin 14.00 mg, folic acid 0.30 mg. <sup>b</sup>: all nutrient levels except digestible energy were measured value.

5 d 收集的全部粪便解冻并混合均匀, 从中分取约 800 g 猪粪样品在 65 °C 恒温干燥箱中烘干至恒重, 粉碎后制备为分析样品。采用过滤法测定饲料和粪便样品中粗纤维的含量, 测定饲料和粪便样品中盐酸不溶灰分含量, 采用指示剂法计算粗纤维的表观消化率, 计算公式如下:

粗纤维表观消化率=100%-

$$\frac{\text{饲料中指示剂含量}}{\text{粪中指示剂含量}} \times \frac{\text{粪中养分含量}}{\text{饲料中养分含量}} \times 100\%$$

### 1.3 粪样采集与测序分析

在试验第 15 天, 每个处理分别收集 6 头猪排出的干净粪便, 采集内部粪样装入 5 mL Axygen 冻存管中, 立即放入液氮中速冻, 存放于-80 °C 冰箱中待测。采用干冰冷冻, 将放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪各 6 个样品送至上海派森诺生物科技有限公司进行 DNA 提取、PCR 扩增、高通量测序与生物信息学分析。

#### 1.3.1 总 DNA 提取

使用 DNA 分离试剂盒(OMEGA, 美国)按照制造商说明书提取微生物基因组总 DNA 样

本, 并在-20 °C 保存后进行进一步分析。分别使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)和 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的数量和质量。

#### 1.3.2 PCR 扩增

将微生物基因组总 DNA 统一稀释到 20 ng/µL, 采用前引物(5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3')和后引物(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')对标准真菌 ITS 全长序列进行两步 PCR 扩增, 并在第二步 PCR 中将样品特异性的 16 bp barcode 插入正向引物和反向引物中。两步 PCR 的扩增体系(25 µL)均包括 5 µL Q5 反应缓冲液(5×), 5 µL Q5 高保真 GC 缓冲液(5×), 0.25 µL Q5 高保真 DNA 聚合酶(5 U/µL), 2 µL dNTPs (2.5 mmol/L), 1 µL 正向引物(10 µmol/L), 1 µL 反向引物(10 µmol/L), 2 µL DNA 模板, 8.75 µL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增首先在 98 °C 预变性 2 min, 然后分别做 25/10 循环, 具体为 98 °C 扩增 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环结束后分别在 72 °C 延伸 5 min。

### 1.3.3 高通量测序

PCR 扩增物用 Agcourt AMPure 磁珠 (Beckman Coulter, 美国) 纯化, 并使用 PicoGreen dsDNA 检测试剂盒 (Invitrogen, 美国) 进行定量, 采用 Template Prep Kit 1.0 试剂盒 (PacBio, 美国) 制备测序文库。在单个定量步骤后, 将等量聚合扩增子利用 PacBio Sequel 三代测序平台进行 SMRT 测序。

### 1.3.4 生物信息学分析

对 PacBio 测序的原始下机数据使用 CCS 软件进行处理获得原始 fastq 序列; 对问题样本进行重测、补测。CCS 序列按照 barcode 信息, 进行样本划分, 并去除 barcode 序列; 同时根据引物信息将反向互补序列转置为正向序列。对获得的序列按 97% 的序列相似度进行归并和分类操作单元 (OTU) 划分, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。按照适用于 PacBio 的 QIIME2 dada2 分析流程<sup>[12]</sup>以及 Vsearch 软件的分析流程<sup>[13]</sup>进行序列去噪或 OTU 聚类, 并进行深度设为最低样本序列量 95% 的抽平处理。采用 QIIME2 (2019.4) 软件<sup>[14]</sup>, 选用 UNITE 数据库 (Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>)<sup>[15]</sup>进行物种分类学注释与物种组成分析。使用未抽平的 OTU 表, 采用 QIIME2 (2019.4) 软件调用“qiime diversity alpha-rarefaction”命令, 最小抽平深度为 10, 参数为全体样本中最低测序深度样本序列量的 95%, 再在这一深度与最小深度之间均匀选取 10 个深度值, 每个深度值抽平 10 次, 计算 Alpha 多样性指数; 使用抽平后的 OTU 表, 调用“qiime diversity core-metrics-phylogenetic”命令, 计算 4 种差异距离矩阵, 并对这些距离矩阵做 PCoA 分析。

### 1.4 数据统计分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据差异显著性分析, 以 0.05 作为差异显著性水平, 0.01 作为

差异极显著水平; 将饲粮粗纤维消化率与粪便真菌群落相对丰度进行 Pearson 相关分析; \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

### 1.5 序列登录号

本研究的原始测序数据已上传到 NCBI SRA 数据库中, 序列登录号为 SRP312601。

## 2 结果与分析

### 2.1 物种组成分析

对全部样本中所包含的高质量序列的长度分布进行统计后, 序列平均长度为 1 262.74 bp。通过对抽平后的 OTU 表格进行统计, 可以获得每个样本中的真菌群落各分类水平的具体组成, 计算得到不同样本在各分类水平所含有的分类单元数 (图 1)。放牧藏猪在各分类水平的分类单元数均显著高于舍饲藏猪与 DLY 猪 ( $P < 0.05$ ), 舍饲藏猪与 DLY 猪间无显著差异 ( $P \geq 0.05$ )。

通过分析样本在门、纲、目、科、属、种 6 个分类水平的结果, 共鉴定出 4 个门、13 个纲、23 个目、39 个科、55 个属、58 个种, 其中放牧藏猪共分为 4 个门、12 个纲、20 个目、

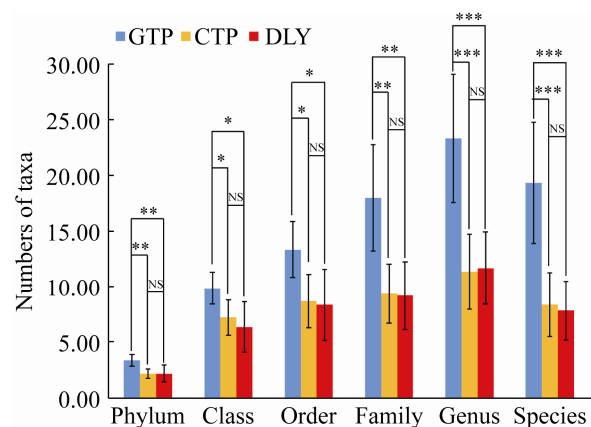


图 1 放牧藏猪、舍饲藏猪与 DLY 猪粪便样本各水平真菌分类单元

Figure 1 Fungal taxa at various classification levels of fecal samples from the grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs.

34 个科、46 个属、44 个种，舍饲藏猪共分为 3 个门、11 个纲、16 个目、19 个科、21 个属、16 个种，DLY 猪共分为 3 个门、11 个纲、16 个目、19 个科、25 个属、19 个种。将相对丰度大于 1% 的真菌类群进行汇总与显著性统计，结

果见图 2 与表 2。

子囊菌门 (*Ascomycota*) 和担子菌门 (*Basidiomycota*) 是放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪的优势菌门，其中放牧藏猪种相对丰度分别为 65.34% 和 9.26%，舍饲藏猪为 61.14% 和 11.47%，

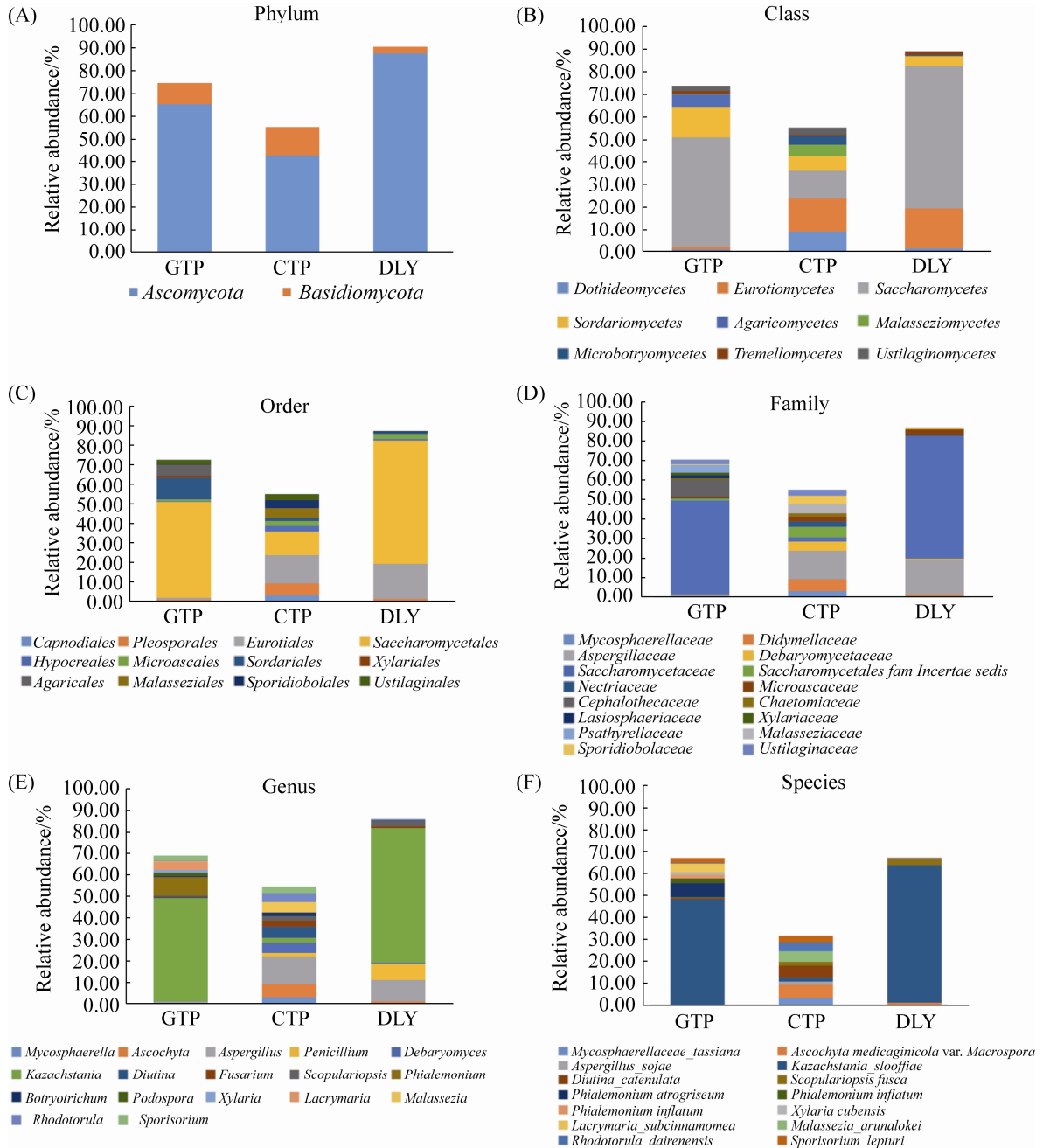


图 2 各分类水平主要真菌类群的相对丰度

Figure 2 Relative abundances of major fungal groups at different taxonomic levels.

表 2 各分类水平差异分类学组成分析

Table 2 Analysis of the taxonomic composition of the differences among various taxonomic levels

Taxa	GTP	CTP	DLY	P value
Phylum				
<i>Ascomycota</i>	65.34±26.58	61.14±20.62	87.46±12.12	0.117
<i>Basidiomycota</i>	9.26±11.77	11.47±13.41	2.92±6.40	0.417
Class				
<i>Saccharomycetes</i>	49.06±33.97 <sup>a</sup>	12.22±23.85 <sup>b</sup>	63.23±30.23 <sup>a</sup>	0.025
<i>Agaricomycetes</i>	5.32±6.65 <sup>a</sup>	0.02±0.05 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.046
Order				
<i>Saccharomycetales</i>	49.06±33.97 <sup>a</sup>	12.22±23.85 <sup>b</sup>	63.23±30.23 <sup>a</sup>	0.025
<i>Sordariales</i>	11.04±7.44 <sup>a</sup>	1.68±4.08 <sup>b</sup>	0.88±1.68 <sup>b</sup>	0.005
<i>Xylariales</i>	1.22±1.36 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.025
<i>Agaricales</i>	5.31±6.62 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.045
Family				
<i>Saccharomycetaceae</i>	48.03±34.7 <sup>a</sup>	2.18±3.91 <sup>b</sup>	62.67±30.58 <sup>a</sup>	0.004
<i>Cephalothecaceae</i>	8.59±4.81 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.000
<i>Lasiosphaeriaceae</i>	2.07±2.31 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.024
<i>Xylariaceae</i>	1.22±1.36 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.025
<i>Psathyrellaceae</i>	3.91±4.77 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.040
Genus				
<i>Penicillium</i>	0±0 <sup>b</sup>	1.67±3.97 <sup>b</sup>	7.79±6.47 <sup>a</sup>	0.019
<i>Kazachstania</i>	48.02±34.68 <sup>a</sup>	2.18±3.91 <sup>b</sup>	62.66±30.57 <sup>a</sup>	0.004
<i>Phialemonium</i>	8.59±4.81 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.000
<i>Podospora</i>	2.40±2.50 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.014
<i>Xylaria</i>	1.22±1.36 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.025
<i>Lacrymaria</i>	1.98±0.81 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.000
Species				
<i>Kazachstania slooffiae</i>	48.02±34.68 <sup>a</sup>	2.22±4.38 <sup>b</sup>	62.60±30.55 <sup>a</sup>	0.008
<i>Phialemonium atrogriseum</i>	6.35±2.97 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.000
<i>Phialemonium inflatum</i>	2.24±2.00 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.008
<i>Podospora communis</i>	1.60±2.30 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.021
<i>Xylaria cubensis</i>	1.22±1.36 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.034
<i>Lacrymaria subcinnamomea</i>	1.98±0.81 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.000

Data in the same row with different shoulder marks indicate significant differences. The same as below.

DLY 猪为 87.46%和 2.92%，相对丰度在放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪间均无显著差异 ( $P \geq 0.05$ )。放牧藏猪相对丰度最丰富的 3 个纲分别是酵母纲(*Saccharomycetes*) (49.06%)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*) (13.54%)和伞菌纲

(*Agaricomycetidae*) (5.32%)，舍饲藏猪和 DLY 猪分别是散囊菌纲(*Eurotiomycetes*) (14.48%和 17.96%)、酵母纲(*Saccharomycetes*) (12.22%和 63.23%)和粪壳菌纲(*Sordariomycetes*) (6.98%和 4.23%)；放牧藏猪相对丰度最丰富的 3 个目分

别是酵母目(*Saccharomycetes*)(49.06%)、粪壳菌目(*Sordariales*)(11.04%)和伞菌目(*Agaricales*)(5.31%)，舍饲藏猪分别是散囊菌目(*Eurotiales*)(14.48%)、酵母目(*Saccharomycetes*)(12.22%)和腔囊目(*Pleosporales*)(6.08%)，DLY猪分别是酵母目(*Saccharomycetes*)(63.23%)、散囊菌目(*Eurotiales*)(17.83%)和囊菌目(*Plectascales*)(2.63%)；放牧藏猪相对丰度最丰富的3个科分别是酵母科(*Saccharomycetaceae*)(48.03%)、头孢科(*Cephalothecaceae*)(8.59%)和鬼伞科(*Psathyrellaceae*)(3.91%)，舍饲藏猪分别是曲霉科(*Aspergillaceae*)(14.48%)、亚隔孢壳科(*Didymellaceae*)(6.08%)和金丝酵母菌科(*Saccharomycetales fam. Incertae sedis*)(5.26%)，DLY猪分别是酵母科(*Saccharomycetaceae*)(62.67%)、曲霉科(*Aspergillaceae*)(17.83%)和小囊菌科(*Microascaceae*)(2.63%)；放牧藏猪相对丰度最丰富的3个属分别是 *Kazachstania* (48.02%)、单孢瓶霉属(*Phialemonium*)(8.59%)和柄孢壳菌属(*Podospora*)(2.40%)，舍饲藏猪分别是曲霉属(*Aspergillus*)(12.82%)、壳二孢属(*Ascochyta*)(6.08%)和 *Diutina* (5.26%)，DLY猪分别是 *Kazachstania* (62.66%)、曲霉属(*Aspergillus*)(10.03%)和青霉属(*Penicillium*)(7.79%)；放牧藏猪相对丰度最丰富的3个种分别是 *Kazachstania slooffiae* (48.02%)、*Phialemonium atrogriseum* (6.35%)和 *Phialemonium inflatum* (2.24%)，舍饲藏猪分别是 *Ascochyta medicaginicola* var. *macrospora* (7.28%)、*Diutina catenulate* (6.31%)和 *Malassezia arunalokei* (5.84%)，DLY猪分别是 *Kazachstania slooffiae* (62.60%)、*Scopulariopsis fusca* (2.48%)和 *Ascochyta medicaginicola* var. *macrospora* (1.06%)。

在纲、目、科、属、种水平下，放牧藏猪多个真菌类群相对丰度显著高于舍饲藏猪与

DLY猪( $P < 0.05$ )，分别是隶属于担子菌门(*Basidiomycota*)的伞菌纲(*Agaricomycetes*)、伞菌目(*Agaricales*)、鬼伞科(*Psathyrellaceae*)、*Lacrymaria*与*Lacrymaria subcinnamomea*，隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)的炭角菌目(*Sordariales*)、炭角菌科(*Xylariaceae*)、*Xylaria*、*Xylaria cubensis*与粪壳菌目(*Sordariales*)、毛球壳科(*Lasiosphaeriaceae*)、柄孢壳菌属(*Podospora*)、*Podospora communis*以及隶属于粪壳菌目(*Sordariales*)的头孢科(*Cephalothecaceae*)、*Phialemonium*、*Phialemonium atrogriseum*、*Phialemonium inflatum*。但放牧藏猪的青霉属(*Penicillium*)相对丰度显著低于舍饲藏猪与DLY猪( $P < 0.05$ )，青霉属(*Penicillium*)隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)、散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)、散囊菌目(*Eurotiales*)、曲霉科(*Aspergillaceae*)。舍饲藏猪隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)的酵母纲(*Saccharomycetes*)、酵母目(*Saccharomycetales*)、酵母科(*Saccharomycetaceae*)、*Kazachstania*与*Kazachstania slooffiae*相对丰度均显著低于放牧藏猪与DLY猪( $P < 0.05$ )，放牧藏猪与DLY猪间差异不显著( $P \geq 0.05$ )。

## 2.2 Alpha 多样性分析

Alpha多样性是指局部均匀生境下的物种在丰富度、多样性和均匀度等方面的指标，也被称为生境内多样性。通过计算(图3)，放牧藏猪粪便中真菌的Chao1指数和Observed species指数极显著高于舍饲藏猪与DLY猪( $P < 0.01$ )，Goods coverage指数极显著低于舍饲藏猪与DLY猪( $P < 0.01$ )，Simpson、Shannon和Pielou\_e指数间放牧藏猪、舍饲藏猪和DLY猪差异不显著( $P > 0.05$ )。说明，放牧藏猪粪便中真菌的丰富度高于舍饲藏猪与DLY猪，而表征覆盖度不如舍饲藏猪与杜长大猪。



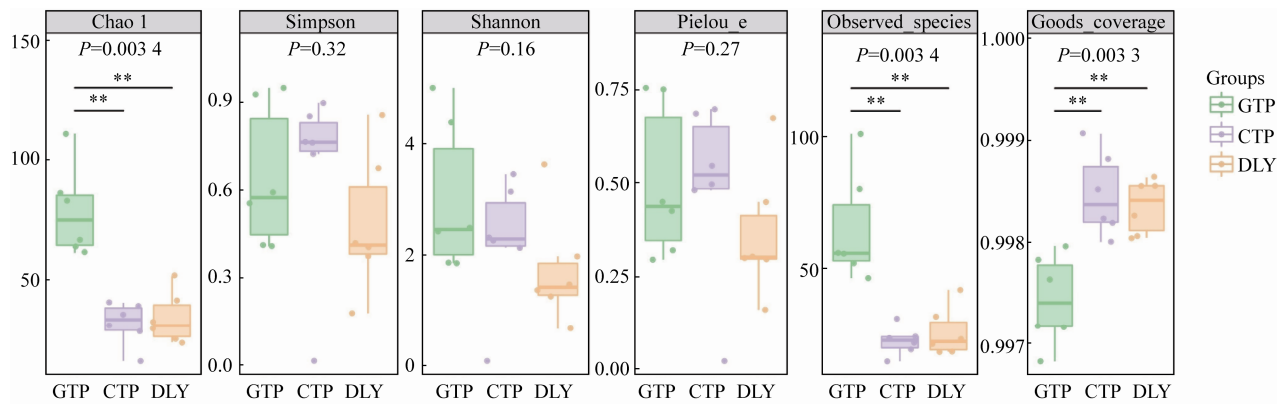


图 3 放牧藏猪、舍饲藏猪与 DLY 猪粪便样本真菌群落 Alpha 多样性指数

Figure 3 Alpha diversity index for fungal community of fecal samples from the grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs.

### 2.3 Beta 多样性分析

Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间, 物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率, 因此也被称为生境间多样性。通过主坐标分析(PCoA, 图 4)可见, 坐标轴所能解释的样本差异数据的比例分别为 35.09%、

9.007%与 7.303%, 放牧藏猪 6 个粪便样本间差异小, 彼此聚集在一个小的范围内, 但与舍饲藏猪、DLY 猪间清晰地分开; 舍饲藏猪与 DLY 猪样本交错在一起, 分布在相近的范围内。PCoA 结果反映出, 放牧藏猪主要生活在草地、森林、河谷与农田, 食物来源多样、能够接触多种物质, 舍饲养殖的藏猪与 DLY 猪食物来源单一、生活环境稳定, 因此放牧与舍饲养殖的环境显著地影响了放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪粪便真菌群落间的差异。

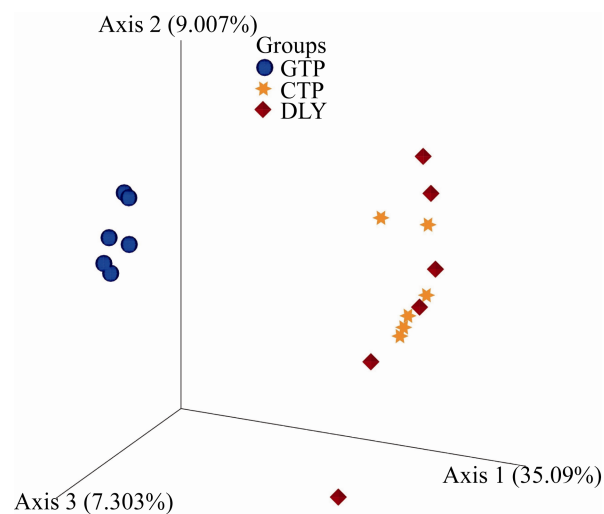


图 4 放牧藏猪、舍饲藏猪与 DLY 猪粪便样本真菌群落主坐标分析

Figure 4 Diagram of principal coordinates analysis for fungal community of fecal samples from the grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs.

### 2.4 物种差异分析与标志物种

通过样本韦恩图(图 5)发现, 放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪共计获得 201 个 OTUs, 其中共有 OTUs 21 个; 放牧藏猪独有 OTUs 130 个, 占到所有 OTUs 的 64.68%, 舍饲藏猪独有 9 个 OTUs (4.48%), DLY 猪独有 16 个 OTUs (7.96%)。可见, 放牧藏猪与舍饲藏猪、DLY 猪间的粪便真菌组成差异很大。

在种水平, 样本按照物种组成数据的欧式距离进行 UPGMA 聚类, 将平均丰度前 50 位种的丰度数据绘制成热图(图 6), 红色色块代表该种在该样本中的丰度较其他样本高, 蓝色色块代表该种在该样本中的丰度较其他样本低, 舍饲藏猪与 DLY 猪被首先聚类为一个大的分支,

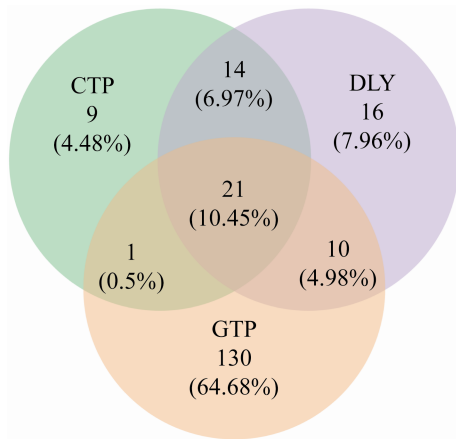


图 5 放牧藏猪、舍饲藏猪与 DLY 猪粪便样本真菌群落种水平韦恩图

Figure 5 The Venn diagrams for fungal community of fecal samples from the grazing Tibetan pigs, captive Tibetan pigs, and DLY pigs at species level.

与放牧藏猪区分开来。放牧藏猪共鉴定了 21 个已知种的真菌为红色色块，其中有 5 个种的真菌显著高于舍饲藏猪与 DLY 猪(表 2,  $P<0.05$ ); 舍饲藏猪共鉴定了 12 个已知种的真菌为红色色块, DLY 猪共鉴定了 6 个已知种的真菌为红色色块。

采用 LEfSe 分析对样本所有分类水平的组成进行差异分析(图 7, 图 8), 结果显示放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪中共有 20 个真菌类群的相对丰度具有显著性差异(LDA score>4.69,  $P<0.05$ )。其中, 放牧藏猪 7 个真菌类群, 分别是粪壳菌目(*Sordariales*)、*Nakaseomyces*、伞菌纲(*Agaricomycetes*)、毛霉门(*Mucoromycota*)、毛霉纲(*Mucoromycetes*)、毛霉菌目(*Mucorales*)

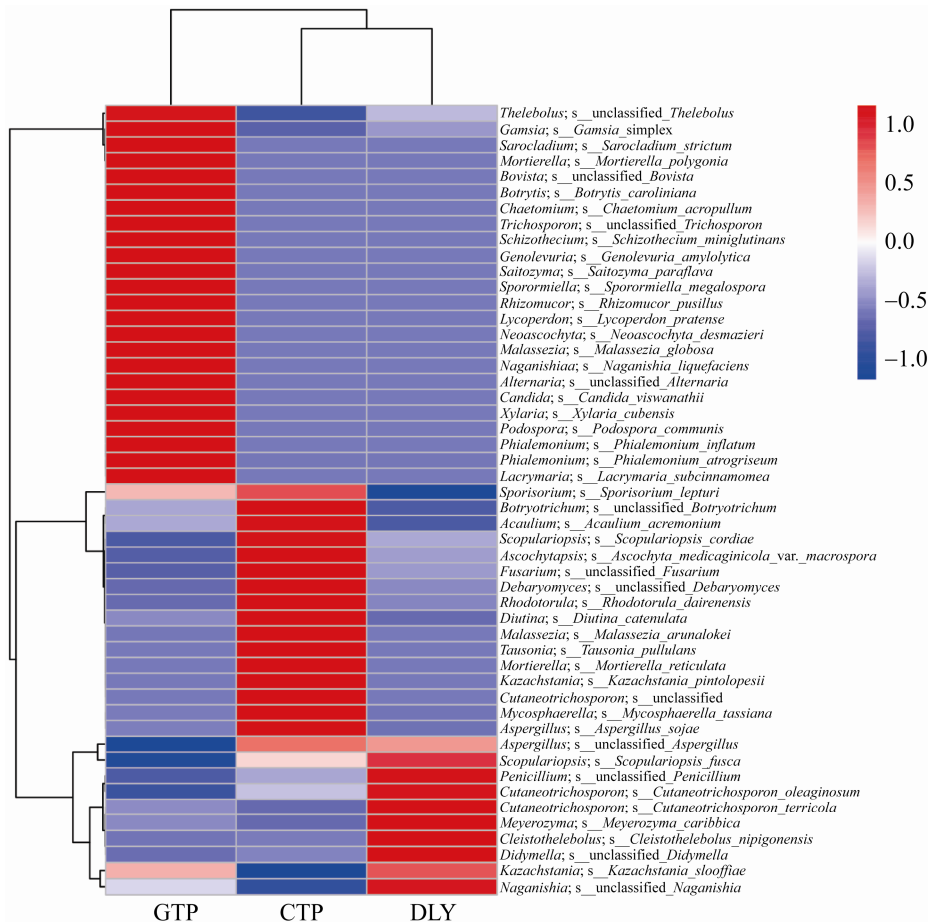


图 6 物种聚类的种水平物种组成热图

Figure 6 Hotmap of species composition by species clustering.

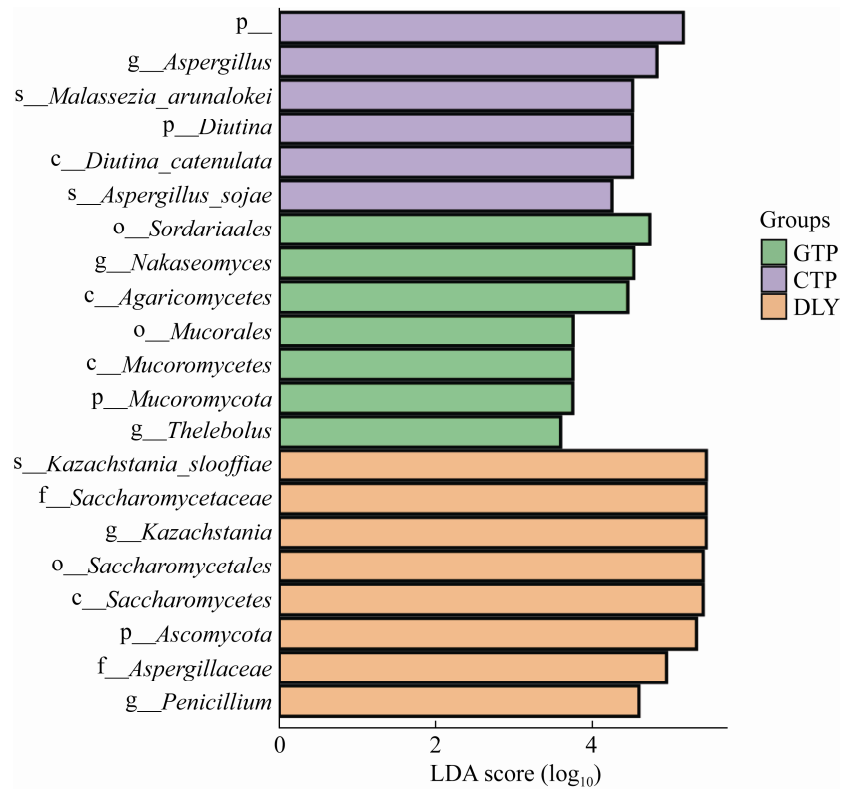


图 7 标志物种的 LDA 效应值柱状图

Figure 7 Histogram of the linear discriminant analysis (LDA) of mark species.

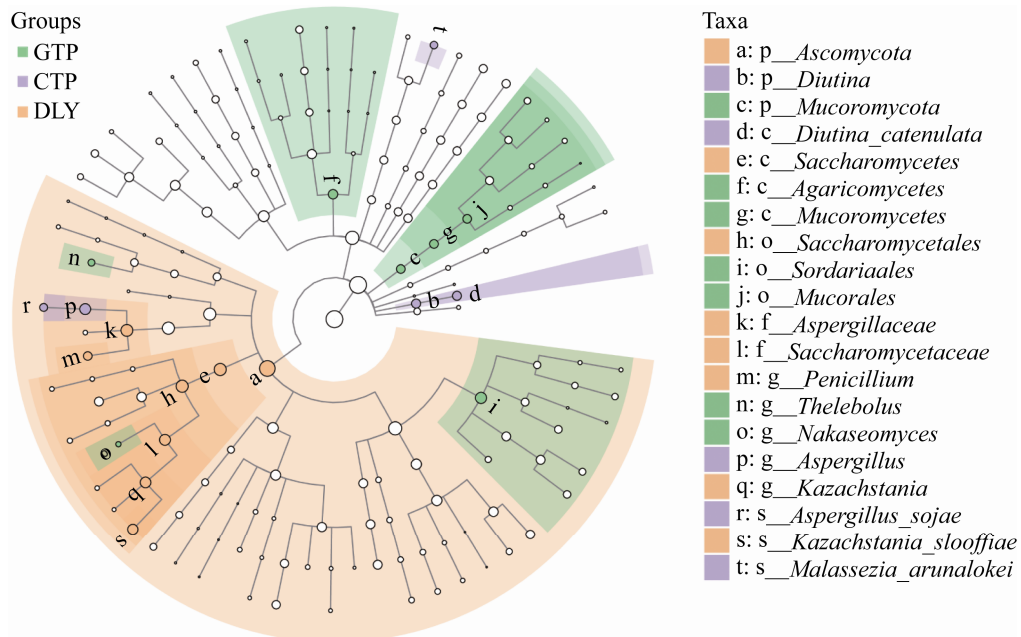


图 8 基于分类等级树的组间差异分类单元

Figure 8 Display of taxon with inter-group differences based on classification hierarchy tree.

与 *Thelebolus*; 舍饲藏猪 5 个真菌类群, 分别是曲霉属(*Aspergillus*)、*Malassezia arunalokei*、*Diutina*、*Diutina catenulata* 与酱油曲霉(*Aspergillus sojae*); DLY 猪 8 个真菌类群, 分别是酵母菌(*Saccharomycetes*)、酵母目(*Saccharomycetales*)、酵母科(*Saccharomycetaceae*)、*Kazachstania*、*Kazachstania slooffiae*、子囊菌门(*Ascomycota*)、曲霉科(*Aspergillaceae*)与青霉属(*Penicillium*)。

## 2.5 粪便真菌群落组成与饲料粗纤维表观消化率的相关性

在试验期内, 放牧藏猪对饲料粗纤维的表观消化率为 44.49%, 显著高于舍饲藏猪(39.94%)与 DLY 猪(38.44%) ( $P < 0.05$ ), 舍饲藏猪与 DLY 猪间饲料粗纤维表观消化率无显著差异( $P > 0.05$ )。

Pearson 相关性分析表明(图 9), 在属水平, *Phialemonium*、柄孢壳属(*Podospora*)、*Lacrymaria* 与饲料粗纤维表观消化率呈显著正相关( $P < 0.05$ ), 曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)

与饲料粗纤维表观消化率呈显著负相关( $P < 0.05$ )。在种水平, *Phialemonium atrogriseum*、*Phialemonium inflatum*、*Podospora communis* 与饲料粗纤维表观消化率呈显著正相关( $P < 0.05$ )。

真菌群落间相关性分析表明(图 9), 在属水平, 球腔菌属(*Mycosphaerella*)与壳二孢属(*Ascochyta*), 德巴利酵母属(*Debaryomyces*)与 *Diutina*, 镰刀菌属(*Fusarium*)与枝葡萄孢属(*Botryotrichum*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、孢堆黑粉菌属(*Sporisorium*), 单胞瓶霉属(*Phialemonium*)与柄孢壳菌属(*Podospora*)、*Lacrymaria*, 枝葡萄孢属(*Botryotrichum*)与红酵母属(*Rhodotorula*)、孢堆黑粉菌属(*Sporisorium*), *Lacrymaria* 与柄孢壳菌属(*Podospora*)、炭角菌属(*Xylaria*), 红酵母属(*Rhodotorula*)与孢堆黑粉菌属(*Sporisorium*)彼此间呈显著协同关系( $P < 0.05$ ), 而 *Kazachstania* 与孢堆黑粉菌属(*Sporisorium*)彼此呈显著拮抗关系( $P < 0.05$ )。在

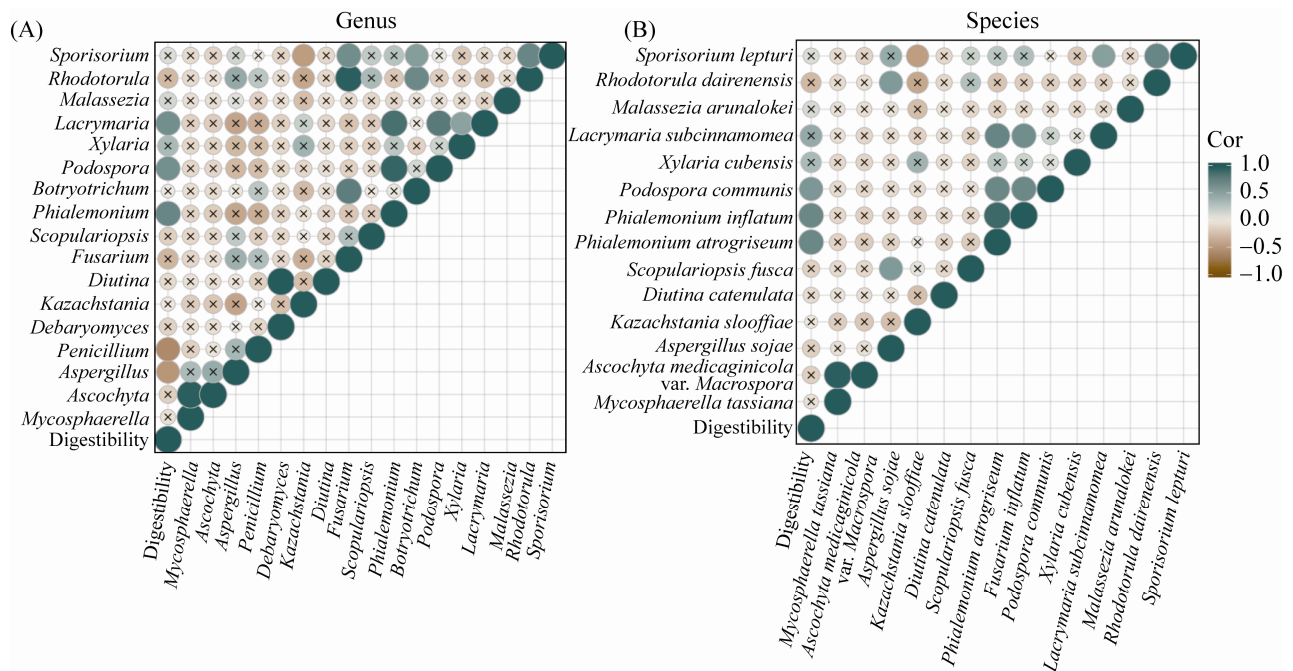


图 9 饲料粗纤维表观消化率与粪便真菌群落的 Pearson 相关性

Figure 9 Pearson's correlation between apparent digestibility of dietary crude fiber and fecal fungal community.

种水平, *Mycosphaerella tassiana* 与 *Ascochyta medicaginicola* var. *Macrospora*, *Aspergillus sojae* 与 *Scopulariopsis fusca*、*Rhodotorula dairenensis*, *Phialemonium atrogriseum* 与 *Phialemonium inflatum*、*Podospora communis*、*Lacrymaria subcinnamomea*, *Phialemonium inflatum* 与 *Podospora communis*、*Lacrymaria subcinnamomea*、*Sporisorium lepturi* 与 *Lacrymaria subcinnamomea*、*Rhodotorula dairenensis* 彼此间呈显著协同关系 ( $P < 0.05$ ), 而 *Kazachstania slooffiae* 与 *Sporisorium lepturi* 彼此呈显著拮抗关系 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论与结论

当前, 放牧养殖仍然是藏猪的重要养殖方式, 使藏猪保留了有别于其他猪种的特异身体机能, 其中耐粗饲和抵抗力强被认为与藏猪肠道微生物关系最为密切。肠道微生物主要包括细菌、真菌和原虫等, 细菌的研究资料最为丰富, 真菌的研究较少。猪的肠道是一个动态微生物种群的家園, 形成一个复杂的生态系统, 并与宿主有共生关系, 肠道微生物在维持猪的营养、生理和免疫功能等方面起着关键作用<sup>[16]</sup>, 尽管真菌在数量上远远少于细菌, 但真菌在动物肠道中的重要性越来越被认识到<sup>[17]</sup>。

第一代测序技术(Sanger 法)测序通量低, 成本较高<sup>[18]</sup>; 第二代测序技术虽然测序通量显著提升, 但测序读长较短、容易错配限制了其应用<sup>[19]</sup>。SMRT 克服了以上缺点, 高通量、长读长、快速度, 应用前景广阔<sup>[20]</sup>。本研究通过 SMRT, 在西藏高原饲养的放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪中获取了高质量的 ITS 序列, 能够鉴定出更加丰富和准确的真菌类群。本研究发现放牧藏猪在各分类水平均获得了更多的分类单元, 说明藏猪在放牧养殖中, 接触了各种食物、水源与土壤等, 环境因子比舍饲圈养多, 影响

了藏猪粪便中真菌的结构。越来越多的研究表明, 食物<sup>[21]</sup>、生存环境<sup>[22]</sup>、宿主基因型和表型<sup>[23]</sup>会显著影响各种哺乳动物肠道菌群的组成。在相同的饲养条件下, 不同时期藏猪粪便真菌 Alpha 多样性指数无显著差异<sup>[6]</sup>, 藏猪与其他品种猪相比 Alpha 多样性指数依然无显著差异<sup>[7]</sup>, 而本试验中放牧藏猪真菌 Alpha 多样性具有更高的丰富度, 独有 OTU 的数量占比极高, 主坐标分析与其他 2 个类型猪清晰地分开, 说明在本试验条件下影响真菌丰富度的关键因素是养殖环境, 品种(藏猪与 DLY 猪)并不是造成粪便真菌差异性的主要因素。相同的研究结果在藏猪肠道细菌中也被发现<sup>[8,24]</sup>。

担子菌门 (*Basidiomycota*) 和子囊菌门 (*Ascomycota*) 是真菌界分布最为广泛的 2 个姊妹群, 位于真菌进化树的顶端, 超过 98% 的已知真菌都属于这 2 个门<sup>[25]</sup>。有研究发现, 在藏猪仔猪阶段, 担子菌门 (*Basidiomycota*) 和子囊菌门 (*Ascomycota*) 合计占 86.35%<sup>[6]</sup>, 为优势菌门, 同样的结果也出现在成华猪和约克夏猪中<sup>[7]</sup>, 同时他们还鉴定到了多个其他真菌门。本研究发现, 5 月龄藏猪粪便中担子菌门 (*Basidiomycota*) 和子囊菌门 (*Ascomycota*) 也处于优势地位, 这与前人研究结果相似; 而其他真菌门类群少、相对丰度极低(毛霉亚门 *Mucoromycota*、球囊菌门 *Mortierellomycota*), 这与前人研究结果不完全一致, 这可能与测试动物的养殖环境和测序方式不同(本研究采用三代测序, 其他研究采用二代测序)有关。通过研究, 我们发现在其他分类水平, 放牧藏猪具有更丰富的真菌类群, 这些真菌类群在动物肠道中的资料缺乏, 可能与放牧藏猪的特异生理机能有关系。本试验研究发现, 放牧藏猪粪便中 *Kazachstania slooffiae* 为优势菌种, 这与前人研究结果是一致的<sup>[17]</sup>。

哺乳动物肠道真菌通过先天免疫受体



dectin-1 与免疫系统相互作用,可能导致肠道炎症反应<sup>[26]</sup>。曲霉属(*Aspergillus*)真菌在舍饲藏猪和 DLY 猪粪便中有较高的丰度,分别达到了 12.82%和 10.03%,该属含有较多的有害菌,代谢产物也有一定的危害<sup>[27]</sup>,丰度太高可能表明舍饲养殖的这 2 个类型猪面临较多的病原风险,间接证明放牧养殖的藏猪肠道健康程度更佳。有研究表明,断奶仔猪结肠内曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)真菌群落的相对丰度显著高于盲肠,且二者呈显著正相关<sup>[7]</sup>,本试验中,放牧藏猪粪便中未发现曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)真菌,而舍饲藏猪与 DLY 猪粪便中均发现较高丰度曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)真菌,这与其研究结果一致。耐粗饲特性与肠道微生物的纤维降解活性有重要关系,已在藏猪肠道发现多个具有纤维降解活性的细菌<sup>[28]</sup>,关于藏猪肠道真菌与纤维降解的研究还鲜有报道。有研究表明,猪体内与短链脂肪酸产生有关的真菌有革菌属(*Tomentella*)、*Loreleia*<sup>[7]</sup>、镰刀菌属(*Fusarium*)、*Plectosphaerella*、绿僵菌属(*Metarhizium*)<sup>[29]</sup>。藏猪具有耐粗饲的优良特性,与其生存环境密切相关,本研究发现,在放牧藏猪粪便真菌群落中,鉴定出了 5 个主要真菌的种,分别是 *Phialemonium atrogriseum*、*Phialemonium inflatum*、*Podospora communis*、古巴炭角菌(*Xylaria cubensis*)、*Lacrymaria subcinnamomea*,这 5 个种真菌在舍饲藏猪与 DLY 猪粪便样品中没有检测到,并且其中 3 种与饲料粗纤维的表观消化率呈显著正相关,可能与藏猪的耐粗饲特性有关。

本试验通过 SMRT 鉴定了青藏高原放牧藏猪、舍饲藏猪和 DLY 猪粪便真菌群落的组成,发现放牧藏猪、舍饲藏猪与 DLY 猪粪便真菌群落的结构和多样性明显不同。结果说明,养殖

方式显著影响藏猪粪便真菌群落的结构和多样性,放牧藏猪具有较强的纤维消化能力,有多个真菌群落与饲料纤维消化相关,提示我们可以从放牧藏猪肠道内鉴定出更丰富的真菌类群进行深入开发,有利于我们进一步研究藏猪耐粗饲等优良特性。

## 参考文献

- [1] Yang SL, Zhang H, Mao HM, Yan DW, Lu SX, Lian LS, Zhao GY, Yan YL, Deng WD, Shi XW, Han SX, Li S, Wang XJ, Gou X. The local origin of the Tibetan pig and additional insights into the origin of Asian pigs. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28215.
- [2] Shang ZD, Tan ZK, Liu SZ, Li JK, Qiang-Ba YZ, Shang P, Wang HH. Characterization of bacterial microbiota diversity in Tibetan pigs fed with green forage in Linzhi of the Tibet autonomous region. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2019, 33(2): 447–455.
- [3] Meng F, Ma L, Ji S, Yang W, Cao B. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(3): 306–312.
- [4] Diao H, Xiao Y, Yan HL, Yu B, He J, Zheng P, Yu J, Mao XB, Chen DW. Effects of early transplantation of the faecal microbiota from Tibetan pigs on the gut development of DSS-challenged piglets. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 1–11.
- [5] 刘杏忠. 真菌学研究的进展及机遇——真菌学国家重点实验室专刊序言. *菌物学报*, 2015, 34(5): 795–798.  
Liu XZ. Advances and challenges in fungal researches—preface to the special issue for the state key laboratory of mycology. *Mycosystema*, 2015, 34(5): 795–798. (in Chinese)
- [6] 孔庆辉, 刘瑶, 索朗斯珠, 刘锁珠, 谭占坤, 商鹏, 商振达. 藏仔猪粪便真菌菌群多样性分析. *菌物学报*, 2020, 39(7): 1241–1249.  
Kong QH, Liu Y, Suo L, Liu SZ, Tan ZK, Shang P, Shang ZD. Fungal diversity in Tibetan piglet fecal samples. *Mycosystema*, 2020, 39(7): 1241–1249. (in Chinese)
- [7] Li JY, Chen DW, Yu B, He J, Huang ZQ, Mao XB, Zheng P, Yu J, Luo JQ, Tian G, Luo YH. The fungal

- community and its interaction with the concentration of short-chain fatty acids in the faeces of Chenghua, Yorkshire and Tibetan pigs. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(2): 509–521.
- [8] 谭占坤, 商振达, 刘锁珠, 商鹏, 强巴央宗. 西藏高原藏猪盲肠微生物群落结构与多样性的研究. 畜牧兽医学报, 2020, 51(9): 2147–2155.  
Tan ZK, Shang ZD, Liu SZ, Shang P, Qiangba YZ. Study on the cecal microbial community structure and diversity of Tibetan pigs in Tibetan Plateau. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(9): 2147–2155. (in Chinese)
- [9] Jin H, Mo LX, Pan L, Hou Q, Li CJ, Darima I, Yu J. Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(8): 6885–6896.
- [10] O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5544–5550.
- [11] 谭占坤, 高瑞玲, 商振达, 李述方, 刘锁珠, 商鹏, 强巴央宗. 盐酸不溶灰分作为指示剂测定藏猪饲料养分的表观消化率. 高原农业, 2019, 3(2): 153–158.  
Tan ZK, Gao RL, Shang ZD, Li SF, Liu SZ, Shang P, Qiangba YZ. Acid-insoluble ash as a marker to determine apparent digestibility in Tibetan pigs. *Journal of Plateau Agriculture*, 2019, 3(2): 153–158. (in Chinese)
- [12] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581–583.
- [13] Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [14] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo JR, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang LJ, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, Van Der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, Von Hippel M, Walters W, Wan YH, Wang MX, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang YL, Zhu QY, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852–857.
- [15] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schübler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [16] Fouchse JM, Zijlstra RT, Willing BP. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*, 2016, 6(3): 30–36.
- [17] Summers KL, Frey JF, Ramsay TG, Arfken AM. The piglet mycobiome during the weaning transition: a pilot study. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(7): 2889–2900.
- [18] 马丽娜, 杨进波, 丁逸菲, 李颖康. 三代测序技术及其应用研究进展. 中国畜牧兽医, 2019, 46(8): 2246–2256.  
Ma LN, Yang JB, Ding YF, Li YK. Research progress on three generations sequencing technology and its application. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(8): 2246–2256. (in Chinese)
- [19] 唐勇, 刘旭. 基于 SMRT 测序技术的 16S rRNA 基因全长测序及其分析方法. 生物技术通报, 2017, 33(8): 34–39.

- Tang Y, Liu X. Full-length sequencing of 16S rRNA gene and its analysis based on the SMRT sequencing technology. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(8): 34–39. (in Chinese)
- [20] 曹晨霞, 韩琬, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269–2276. Cao CX, Han W, Zhang HP. Application of third generation sequencing technology to microbial research. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2269–2276. (in Chinese)
- [21] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14691–14696.
- [22] Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma FR, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua KJ, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson DA, Pomp D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(44): 18933–18938.
- [23] Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, Seo KS, Kang DK. Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(8): 646–651.
- [24] Yang WP, Xin HY, Cao FJ, Hou JX, Ma L, Bao LJ, Wang FY, Yu ZT, Cao BY. The significance of the diversity and composition of the cecal microbiota of the Tibetan swine. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(4): 185–194.
- [25] 王海英, 郭守玉, 黄满荣, LUMBSCH HT, 魏江春. 子囊菌较担子菌具有更快的进化速率和更高的物种多样性. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(8): 731–737, 765–772. Wang HY, Guo SY, Huang MR, Thorsten L, Wei JC. Ascomycota has a faster evolutionary rate and higher species diversity than basidiomycota. *Scientia Sinica: Vitae*, 2010, 40(8): 731–737, 765–772. (in Chinese)
- [26] Iliiev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, Brown J, Becker CA, Fleshner PR, Dubinsky M, Rotter JI, Wang HL, McGovern DPB, Brown GD, Underhill DM. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science*, 2012, 336(6086): 1314–1317.
- [27] Kanora A, Maes D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinární Medicina*, 2010, 54(12): 565–576.
- [28] 杨伟平. 藏猪肠道细菌群落组成与纤维素分解菌的研究. 西北农林科技大学论文, 2015.
- [29] Li JY, Luo YH, Chen DW, Yu B, He J, Huang ZQ, Mao XB, Zheng P, Yu J, Luo JQ, Tian G, Yan H, Wang QY, Wang HF. The fungal community and its interaction with the concentration of short-chain fatty acids in the *Caecum* and colon of weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(2): 616–628.

(本文责编 李磊)