

基于 ITS 高通量测序技术研究果寡糖对奶牛瘤胃真菌菌群的影响*

冶文兴, 张 洁, 李 娜, 张力莉, 徐晓锋**

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:【目的】利用 ITS 高通量测序分析技术研究果寡糖对奶牛瘤胃真菌菌群的影响。【方法】采用两阶段交叉设计, 选择泌乳阶段相近、胎次相同、健康状况良好的泌乳期奶牛 4 头。随机分为 2 组, 对照组饲喂基础饲料, 试验组在基础饲料中添加果寡糖, 添加量为 60 g/(cow·d)。【结果】本试验条件下, 在日粮中添加果寡糖并未显著影响奶牛瘤胃真菌的多样性 ($P>0.05$), 但优势菌属的相对丰度在两组之间存在差异, 其中接合菌门 (Zygomycota) 仅存在于对照组, 新丽鞭毛菌门 (Neocallimastigomycota) 相对丰度试验组比对照组增加了 628.28%, 但差异不显著 ($P=0.21$)。试验组假丝酵母属 (*Candida*) 和平革菌属 (*Phanerochaete*) 相对丰度极显著高于对照组 ($P=0.001$ 、 $P=0.003$), 试验组毛壳属 (*Chaetomidium*) 相对丰度显著增加 ($P=0.037$), 试验组瘤胃壶菌属 (*Piromyces*) 相对丰度较对照组增加 1 205.71%, 但差异不显著 ($P=0.135$)。试验组柄孢壳属 (*Zopfiella*) 和德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*) 相对丰度比对照组分别降低 99.08% 和 64.14%, 但差异不显著 ($P=0.523$ 、 $P=0.671$)。【结论】日粮中果寡糖的添加对奶牛瘤胃真菌菌群的多样性并未产生明显的影响, 但优势菌比例发生变化, 瘤胃中瘤胃壶菌属、平革菌属等纤维降解菌的相对丰度提高, 增强了瘤胃真菌菌群对纤维的降解能力。

关键词: ITS 高通量测序技术; 奶牛; 果寡糖; 瘤胃真菌菌群

中图分类号: S 852.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 06-0965-06

Effect of Fructooligosaccharide on the Rumen Fungi Flora of Dairy Cows by ITS High-throughput Sequencing Technology

YE Wenxing, ZHANG Jie, LI Na, ZHANG Lili, XU Xiaofeng

(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: [Purpose] To study the effect of fructooligosaccharides on the rumen fungal flora of dairy cows by using ITS high-throughput sequencing analysis technology. [Method] A two-stage cross design was adopted to select 4 lactating cows with similar lactation stages, the same number of foetus and good health. Two groups were randomly divided into two groups. The control group was fed with basic diets, and the experimental group was supplemented with fructooligosaccharide at a dosage of 60 g/(cow·d). [Result] The test conditions, fruit sugar added in the diet did not significantly affect the rumen fungi diversity ($P>0.05$), but there were differences of the relative abundance of the dominant fungi between the two groups, and Zygomycota existed only in the control group, the

收稿日期: 2019-03-22

修回日期: 2019-09-28

网络首发时间: 2019-11-27 11:48:56

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460619)。

作者简介: 冶文兴 (1994—), 男, 回族, 宁夏西吉人, 在读硕士研究生, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究。E-mail: yewenxingzz@126.com

**通信作者 Corresponding author: 徐晓锋 (1978—), 男, 内蒙古突泉人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事奶牛瘤胃微生物发酵调控与消化生理研究。E-mail: xuxiaofengnd@126.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20191126.1717.003.html>



Neocallimastigomycota relative abundance group increased by 628.28% than the control group, but there was no significant difference ($P=0.21$). The relative abundance of *Candida* and *Phanerochaete* in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P=0.001$, $P=0.003$). The relative abundance of *Chaetomidium* in the experimental group was significantly increased ($P=0.037$). The relative abundance of *Piromyces* in the experimental group was increased by 1 205.71% compared with that in the control group, but the difference was not significant ($P=0.135$). The relative abundance of *Zopfiella* and *Debaryomyces* in the experimental group was 99.08% and 64.14% lower than that in the control group, respectively, but the differences were not significant ($P=0.523$, $P=0.671$). [**Conclusion**] The addition of fructooligosaccharide in the diet had no significant effect on the diversity of the fungal flora in the rumen of cows, and the proportion of dominant bacteria changed, which enhanced the ability of the fungal flora in the rumen to degrade the fibers.

Keywords: ITS high-throughput sequencing technology; dairy cows; fructooligosaccharides; rumen fungi flora

自从 1975 年 ORPIN^[1]首次证实山羊瘤胃中存在厌氧真菌后, 国内外学者又陆续从其他草食动物的消化道和环境中广泛发现并分离出 10 多种厌氧真菌^[2]。厌氧真菌在超显微结构和生物化学性质上与需氧真菌有严格的区分, 根据菌丝体形成孢子囊的个数, 可将厌氧真菌划分为多中心和单中心 2 个类型^[3-4]。真菌通过产生不同种类的木质纤维素降解酶以及真菌菌丝对植物组织细胞壁的穿透作用, 在瘤胃对纤维降解中发挥重要作用^[5]。魏亚琴^[6]通过研究牦牛瘤胃厌氧真菌与甲烷菌共培养表明瘤胃壶菌属和甲烷菌共培养在不同程度上提高了真菌对秸秆的降解能力。而瘤胃厌氧真菌对纤维素的降解主要通过从孢子囊中释放出的游动孢子游动到易于集聚的植物组织部位, 穿透牧草角质层屏障, 降解无法被细菌和纤毛虫降解的木质素纤维物质^[7-9], 还可以通过合成纤维素酶来降解纤维素^[10]。果寡糖 (fructooligosaccharides, FOS) 是由 1 个葡萄糖基和 2~5 个果糖基以果糖基—果糖连接而成的一组低聚糖的总称^[11]。有研究表明 FOS 具有改善畜禽生产性能、提高机体免疫力等生物学功能^[12-13]。FOS 作为益生元类饲料添加剂改善肠道组织形态^[14], 调节动物肠道中菌群结构^[15], 对脂质代谢以及矿物吸收有一定的调控作用^[16], 广泛用于肉鸡^[14-15]、鹌鹑^[16]、羊^[17]、猪^[18]和奶牛^[19]等动物生产上。本试验通过对泌乳期奶牛日粮添加果寡糖, 研究果寡糖对奶牛瘤胃真菌菌群结构的影响, 为生产实践中奶牛的饲养提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

果寡糖购自河南三化生物科技公司, 纯度为 99%。

1.2 试验动物与管理

本试验选用 2×2 交叉试验设计。选择体况良好, 泌乳天数一致, 日产奶量 30 kg 左右, 体重 (550±35) kg 的 4 头经产 (二胎) 中国荷斯坦泌乳奶牛, 随机分为 2 组, 对照组和试验组。对照组饲喂基础日粮 (表 1), 试验组在基础日粮中添加果寡糖, 添加量为 60 g/(cow·d)。饲喂方式采用 TMR,

表 1 基础饲粮组成及营养水平 (干物质基础)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (dry matter basis)

原料 ingredients	含量/% content	营养水平 nutrient levels	含量/% content
苜蓿干草 alfalfa	21.53	粗蛋白质 CP	17.35
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	3.14	产奶净能 NE _L /(MJ·kg ⁻¹)	7.23
玉米青贮 corn silage	27.65	中性洗涤纤维 NDF	31.25
玉米 corn	24.47	酸性洗涤纤维 ADF	22.63
豆粕 soybean meal	14.68	钙 Ca	0.84
麦麸 wheat	1.48	磷 P	0.40
全棉籽 whole cottonseed	4.20		
预混料 premix	0.91		
磷酸氢钙	0.91		
食盐 NaCl	0.80		
氧化镁 MgO	0.23		
合计 total	100.00		

饮水自由。整个试验期分为 2 个阶段共 21 d, 其中预饲期 14 d, 正式采样期 7 d。

1.3 样品采集与处理

奶牛瘤胃液的采集方法: 将软管从口腔导管送入瘤胃内, 使用牛鼻夹固定牛头, 牛咀嚼过程中瘤胃液顺导管自然流出, 对流出的瘤胃液进行收集即可。采集瘤胃液时间为饲喂前 (0 h) 和饲喂后 (2、6 和 12 h), 每期连续采样 3 d (16、17 和 18 d)。将采集的瘤胃液立即用 4 层纱布过滤, 每天 4 个时间点所采集的瘤胃液样品经混匀后各取 5 mL, 置于离心管中, 作为该样本的代表性样品。将收集的样本快速放入液氮中, 转移到试验室, 于-80 ℃ 冰箱冷冻保存, 用于瘤胃真菌菌群结构的分析。

1.4 DNA 样品提取与扩增

1.4.1 DNA 提取

DNA 采用试剂盒提取, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 提取步骤参照试剂盒中的说明书操作。

1.4.2 PCR 扩增

从样本中提取基因组 DNA 后, 用带有 barcode 的特异引物扩增 ITS rDNA 的 ITS2 区。引物序列为:

F: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3';

R: 5'-ATATGTAGGATGAAGAACGYAGY-RAA-3'。

1.5 Hiseq 测序

将 PCR 扩增产物切胶回收, 用 QuantiFluor-TM 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合, 连接测序接头, 构建测序文库, Hiseq 2500 PE250 上机测序 (广州基迪奥公司)。

1.6 数据统计分析

数据采用 Excel 2007 进行初步处理, 采用 SAS 8.2 统计软件进行数据处理分析。数据由平均值±标准误 (mean±SE) 表示。以 $P<0.05$ 作为差

异显著性判定标准。

2 结果与分析

2.1 OTU 丰度分析

为了更好地获得样品中物种的多样性信息, 剔除低质量片段后, 对片段进行 OTU (Operating Taxonomic Unit) 聚类, 并利用 Mothur (v.1.34.0) 计算 0.03 距离下 (97% 的相似度) 的 OTU 数量。根据 2 组所共有和特有 OTUs 绘制韦恩图 (图 1)。由图 1 可知: 试验组 (FT) 的 OTU 总数为 295, 对照组 (CK) 的 OTU 总数为 317, 2 组共有 OTU 数目为 138。对照组瘤胃真菌菌群多样性大于试验组, 但差异不显著 ($P>0.05$)。

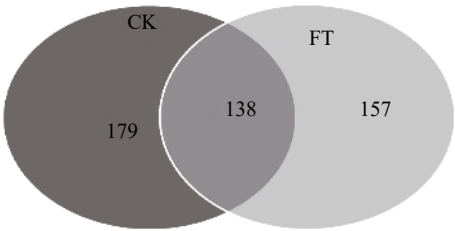


图 1 对照组和试验组瘤胃中真菌 OTUs 韦恩图
Fig. 1 Venn graph of fungus OTUs in the rumen of the control group and the experimental group

2.2 样品 OTU 多样性分析

基于 OTU 聚类分析结果, 进行瘤胃菌群的 Alpha 多样性分析。Alpha 多样性是对单个样品中物种多样性的分析, 包括 Chao1 值、ACE 值、Shannon 以及 Simpson 指数等。Chao1、ACE 值是通过不同的算法对样本进行 OTU 数目的估算预测, ACE、Chao1 值越大表示样本的物种多样性越高。Shannon 指数越大, Simpson 指数越接近于 0, 则表示该样品中的物种越丰富。由表 2 可知: 试验组的 ACE 趋于大于对照组 ($P<0.75$), 试验组的 Chao1 值小于对照组, 但差异不显著 ($P>0.05$)。试验组和对照组的 Simpson 和 Shan-

表 2 对照组和试验组瘤胃真菌菌群多样性指数

Tab. 2 Rumen fungi diversity indexes of control group and test group

指标 index		对照组 (CK) control group	试验组 (FT) experimental group	SEM	P 值 P-value
丰富度指数 richness index	ACE	521.44	564.96	128.49	0.64
	Chao1	407.67	386.58	83.93	0.75
多样性指数 diversity index	Shannon	2.27	2.33	0.86	0.92
	Simpson	0.26	0.23	0.24	0.87
覆盖率 coverage		0.99	0.99	0.006	0.57

non 指数相近。表明在日粮中添加果寡糖对奶牛瘤胃真菌菌群结构的多样性没有明显影响。

2.3 奶牛瘤胃真菌菌群结构的变化

2.3.1 瘤胃真菌在门水平上的结构分析

门水平上, 试验组与对照组奶牛瘤胃液共涉及子囊菌门 (Ascomycota)、新丽鞭毛菌门 (Neocallimastigomycota)、接合菌门 (Zygomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、未注释菌门 (Fungi_NA) 5 个菌门(表 3)。由表 3 可知: 子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota) 是对照组的优势菌门, 占总菌群比例的 96%, 而试验组的优势菌门是子囊菌门 (Ascomycota)、新丽鞭毛菌门 (Neocallimastigomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota), 占到总菌群比例的 99% 以上。日粮中果寡糖的添加使奶牛瘤胃真菌中担子菌门 (Basidiomycota)、新丽鞭毛菌门 (Neocallimastigomycota) 丰度升高。

表 3 试验组与对照组奶牛瘤胃真菌门水平的变化

Tab. 3 Changes in rumen fungal phylum level of cows in the experimental group and the control group %				
门类 phylum	对照组 control group	试验组 experimental group	P 值 P-value	差异倍数 log2-fold
子囊菌门 Ascomycota	83.16	66.83	0.14	-0.31
新丽鞭毛菌门 Neocallimastigomycota	2.22	16.18	0.21	2.86
接合菌门 Zygomycota	0.42	0	0.28	-7.28
担子菌门 Basidiomycota	13.82	16.47	0.69	0.25
未注释菌门 Fungi_NA	0.36	0.50	0.67	0.43

2.3.2 瘤胃真菌在属水平上的结构分析

在属水平上, 2 组共涉及 107 个属, 其中相对丰度在 0.01% 以上的有 30 个。2 组中丰度较高的属有柄孢壳属 (*Zopfiella*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、枝孢属 (*Cladosporium*)、瘤胃壶菌属 (*Piromyces*)、假丝酵母 (*Candida*)。由表 4 可知: 试验组假丝酵母属 (*Candida*) 和平革菌属 (*Phanerochaete*) 丰度极显著高于对照组 ($P<0.01$), 试验组毛壳属 (*Chaetomidium*) 丰度显著增加 ($P<0.05$)。表明日粮中果寡糖的添加显著增加了假丝酵母属 (*Candida*)、平革菌属 (*Phanerochaete*) 和毛壳属 (*Chaetomidium*) 的丰度。

表 4 试验组与对照组奶牛瘤胃真菌属水平的变化

Tab. 4 Changes of rumen fungi genus level in cows in the experimental group and the control group %				
属类 genus	对照组 control group	试验组 experimental group	P 值 P-value	差异倍数 log2-fold
柄孢壳属 <i>Zopfiella</i>	20.76	0.19	0.523	-6.75
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	11.29	14.08	0.940	0.31
德巴利酵母属 <i>Debaryomyces</i>	8.59	3.08	0.671	-1.47
酵母属 <i>Saccharomyces</i>	5.81	6.71	0.936	0.20
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	4.80	19.24	0.734	2.00
青霉菌属 <i>Penicillium</i>	1.42	0.84	0.884	-0.75
刺革菌属 <i>Hymenochaete</i>	1.23	0	0.308	-26.87
未注释虫草科属 <i>Cordycipitaceae_NA</i>	1.17	0.51	0.741	-1.17
侧齿霉属 <i>Engyodontium</i>	0.81	0	0.078	-7.11
瘤胃壶菌属 <i>Piromyces</i>	0.70	9.14	0.135	3.69
未注释新丽鞭毛菌属 <i>Neocallimastigaceae_NA</i>	0.68	1.97	0.798	1.52
刺皮耳属 <i>Heterochaete</i>	0.63	0	0.345	-25.92
新丽鞭菌属 <i>Neocallimastix</i>	0.59	1.05	0.877	0.81
假丝酵母属 <i>Candida</i>	0.003	5.00	0.001	4.23
平革菌属 <i>Phanerochaete</i>	0	0.09	0.003	23.19
毛壳属 <i>Chaetomidium</i>	0	0.01	0.037	20.01

3 讨论

本试验是基于 Hiseq2500 PE250 高通量测序平台对 8 个样本的瘤胃液真菌区系的 ITS2 区进行测序, 对奶牛瘤胃真菌菌群的多样性进行分析, 从测序深度和覆盖度两个方面对测序结果进行评估。本试验 8 个样本的优质序列数总和为 157 212 条, 平均每个样本 19 52 条, 高于 KUMAR 等^[20]对围生期奶牛瘤胃真菌测序深度 (3 558 条); 同时本试验的 8 个样本的真菌区系测序覆盖度均超过了 98.2%, 与张红涛^[21]对荷斯坦后备牛瘤胃真菌区系测序覆盖度 (98%) 相当, 因此, 从测序深度和覆盖度两个角度来看, 本试验取样充分合理并且测序结果得到了大量代表荷斯坦奶牛瘤胃液真菌的绝大多数物种, 可以较真实地反映出瘤胃液真菌菌群的微生物组成情况。

果寡糖具有改善反刍动物瘤胃真菌区系的功能。祁茹等^[22]研究发现: 饲喂果寡糖使崂山奶山羊瘤胃真菌数量在进食后先显著提高, 在 4 h 时达到峰值后下降, 在 8 h 时略有升高。同样胡静等^[23]研究发现: 在日粮中添加果寡糖对奶山羊瘤

胃真菌的影响与时间有关,在0~6 h,各试验组的真菌数量显著高于对照组并在4 h时试验组真菌数量达到最高水平,极显著高于对照组,在10 h时和对照组无显著差异。本试验条件下,试验组的OTU总数为295,对照组的OTU总数为317,2组共有OTU数目为138。试验组的菌群丰富度指数ACE值升高但差异不显著,菌群多样性指数Shannon指数升高、Simpson指数下降也未呈现显著差异,表明在日粮中添加果寡糖对奶牛瘤胃真菌菌群结构的多样性和丰富度有影响但不显著。日粮中添加果寡糖虽然能够小幅度改变真菌菌群某些菌的相对丰度,却不能对瘤胃液真菌菌群的基本组成产生重大影响。分析原因可能是:瘤胃真菌以铵根离子(NH_4^+)和氨基酸形式的氮作为氮源,而果寡糖能够降低瘤胃内pH和氨态氮($\text{NH}_3\text{-N}$)的浓度^[24],提高挥发性脂肪酸含量,改善了瘤胃内环境,加快了真菌的增殖速度,使得真菌数量增多,当果寡糖被全部消化后瘤胃内环境又重新趋于稳定。

本研究表明:从奶牛瘤胃真菌门水平分析,子囊菌门、新丽鞭毛菌门在试验组和对照组中均为优势菌门,这与张红涛^[21]以及LIGGENSTOFFER等^[25]研究结果相一致。本试验在日粮中添加果寡糖使新丽鞭毛菌门(*Neocallimastigomycota*)丰度比对照组增加了628.28%。果寡糖可以被有益菌利用产生菌毒素和有机酸而不能被有害菌利用^[26],且大量学者研究表明:新丽鞭毛菌门是广泛存在于奶牛、羊等反刍动物瘤胃中真菌区系的优势菌门^[25],在对纤维和木质素的消化分解过程中起着重要的作用,其不仅通过假根对植物组织的细胞壁进行物理降解,也通过产生大量的碳水化合物活性酶(CAZymes)、纤维素体和细胞外蛋白酶,降解木质纤维素,并穿透菌丝,破坏植物细胞壁的超微结构^[27-28]。果寡糖能够被新丽鞭毛菌门利用代谢合成自身所需营养物质,促使其丰度增加,同时产生相应的分泌物,促进对粗饲料纤维的降解,提高日粮的利用效率。试验结果表明:奶牛瘤胃液真菌菌群中柄孢壳属、曲霉属、德巴利酵母属、酵母菌属是对照组的优势菌属,而枝孢属、曲霉属、瘤胃壶菌属、酵母属、假丝酵母属是试验组的优势菌属。试验组和对照组的优势菌属发生变化的原因可能是部分真菌可以吸收利用果寡糖,促进自身的增殖,而部分真菌不

会因为果寡糖的添加促进生长,甚至因此生长受到抑制。假丝酵母属由检出菌变为优势菌属且增加极显著。李亚丹等^[29]研究发现:饲喂混合饲料的瘤胃真菌中含有假丝酵母属,而在单一饲喂芒草厌氧的牛瘤胃真菌中未检出。瘤胃壶菌属的相对丰度相比较对照组增加了1 205.71%,但差异不显著。SOLOMON等^[28]研究表明:从食草动物中分离出来的厌氧肠道真菌所产生大量的生物降解酶协同降解未经处理的生物质,瘤胃壶菌属所产生的木聚糖酶活性是工业上广泛应用的木霉和曲霉的3倍以上。同样有研究表明:瘤胃壶菌属和新丽鞭毛菌属对植物秸秆有较强降解作用,主要因为瘤胃壶菌属的丝状假根可以穿透植物细胞壁,使植物纤维类多糖的降解阻力降低,让瘤胃微生物更有效的降解纤维素、半纤维素和果胶等^[30]。WANG等^[31]结合转录组学和蛋白组学研究发现新丽鞭毛菌属分泌木聚糖酶,对纤维的降解发挥重要作用。而在本试验条件下,日粮中添加果寡糖对瘤胃新丽鞭毛菌属和瘤胃壶菌属丰度并无显著影响,但较对照组菌增加,尤其瘤胃壶菌属增加明显,表明果寡糖的添加提高了瘤胃真菌对纤维的降解能力。

4 结论

(1) 日粮中果寡糖的添加对奶牛瘤胃真菌菌群的多样性并未产生明显的影响,优势菌比例发生变化,能够小幅度改变真菌菌群某些菌的相对丰度,却不能对瘤胃液真菌菌群的基本组成产生重大影响。

(2) 添加果寡糖能够提高瘤胃中瘤胃壶菌属、平革菌属等纤维降解菌的相对丰度,增强了瘤胃真菌菌群对纤维的降解能力。

[参考文献]

- [1] ORPIN C G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*[J]. Journal of General Microbiology, 1975, 91(2): 249. DOI: [10.1099/00221287-91-2-249](https://doi.org/10.1099/00221287-91-2-249).
- [2] LI X L, CHEN H, LJUNGDAHL L G. Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce structurally related cellulases and xylanases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(2): 628. DOI: [10.1089/oli.1.1997.7.55](https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.55).
- [3] NICHOLSON M J, THEODOROU M K, BROOKMAN J L. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces*-insights into an AT-rich genome[J]. Micro-

- biology, 2005, 151(1): 121. DOI: [10.1099/mic.0.27353-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27353-0).
- [4] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [5] GRUNINGER R J, PUNIYA A K, CALLAGHAN T M, et al. Anaerobic fungi (phylum, *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(1): 1. DOI: [10.1111/1574-6941.12383](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12383).
- [6] 魏亚琴. 牦牛瘤胃厌氧真菌与甲烷菌共培养物的多样性及其纤维降解特性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [7] 于长青, 张日俊. 瘤胃真菌的营养功能及最新应用前景[J]. 饲料工业, 2004, 25(2): 19. DOI: [10.3969/j.issn.1001-991X.2004.02.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-991X.2004.02.006).
- [8] MORGAVI D P, SAKURADA M, MIZOKAMI M, et al. Effects of ruminal protozoa on cellulose degradation and the growth of an anaerobic ruminal fungus, *Piromyces* sp. strain OTS1, *in vitro*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(10): 3718. DOI: [10.1016/s0040-6031\(97\)00322-5](https://doi.org/10.1016/s0040-6031(97)00322-5).
- [9] 邓凯东. 反刍动物瘤胃真菌的作用[J]. 草食家畜, 1998 (2): 33. DOI: [10.16863/j.cnki.1003-6377.1998.02.011](https://doi.org/10.16863/j.cnki.1003-6377.1998.02.011).
- [10] 毛胜勇, 朱伟云. 反刍动物瘤胃真菌的研究进展[J]. 中国奶牛, 2000(5): 26. DOI: [10.3969/j.issn.1004-4264.2000.05.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-4264.2000.05.012).
- [11] 胡学智, 伍剑锋. 低聚果糖的生理功能及生产、应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(6): 148. DOI: [10.3969/j.issn.1006-2513.2007.06.030](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-2513.2007.06.030).
- [12] 谭聪灵, 夏中生, 李永民, 等. 饲料中添加果寡糖对生长猪生产性能和免疫机能的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2010(4): 45. DOI: [10.3969/j.issn.1003-6202.2010.04.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-6202.2010.04.013).
- [13] 王国杰, 柯叶艳, 韩正康. 寡果糖对蛋用鹌鹑生产性能、脂肪代谢、免疫和内分泌机能的影响[J]. 畜牧与兽医, 2000, 32(6): 1. DOI: [10.3969/j.issn.0529-5130.2000.06.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-5130.2000.06.001).
- [14] 易中华, 马秋刚, 张建云, 等. 果寡糖和芽孢杆菌对肉仔鸡肠黏膜形态结构的影响[J]. 当代畜牧, 2008, 17(8): 40. DOI: [10.3969/j.issn.1005-8613.2008.06.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-8613.2008.06.013).
- [15] 张厂, 胡先勤, 郭福有, 等. 果寡糖对肉鸡生产性能、肠道菌群、消化酶活性及屠宰性能的影响[J]. 中国家禽, 2007, 29(15): 14. DOI: [10.3969/j.issn.1004-6364.2007.15.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-6364.2007.15.004).
- [16] 郭勇庆, 张英杰, 刘月琴, 等. 不同剂量牛蒡果寡糖对绵羊生产性能和氮平衡的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 15. DOI: [10.3969/j.issn.1007-7774.2010.03.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7774.2010.03.006).
- [17] 黄杰河, 于桂阳, 郑春芳. 饲料中添加果寡糖对鹌鹑生产性能与胆固醇含量的影响[J]. 经济动物学报, 2010, 14(1): 35. DOI: [10.3969/j.issn.1007-7448.2010.01.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7448.2010.01.009).
- [18] 葛婷. 果寡糖对猪后肠蛋白质发酵及微生物菌群的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [19] GRAND E, RESPONDEK F, MARTINEAU C, et al. Effects of short-chain fructooligosaccharides on growth performance of preruminant veal calves[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(2): 1094. DOI: [10.3168/jds.2011-4949](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4949).
- [20] KUMAR S, INDUGU N, VECCHIARELLI B, et al. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 781. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00781](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00781).
- [21] 张红涛. 不同玉米青贮水平对荷斯坦后备牛瘤胃液微生物组及其代谢组的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [22] 祁茹, 温建新, 程明, 等. 不同外源寡糖对崂山奶山羊瘤胃微生物区系的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(2): 349. DOI: [10.3969/j.issn.1006-267x.2012.02.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2012.02.023).
- [23] 胡静, 于子洋, 朱亚骏, 等. 果寡糖对奶山羊瘤胃微生物区系及常用粗饲料瘤胃降解率的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(7): 1988. DOI: [10.3969/j.issn.1006-267x.2014.07.034](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-267x.2014.07.034).
- [24] QU M R, LING B M, LU D X, et al. Effect of fructooligosaccharides infusion on rumen fermentation characteristic in sheep[J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2006, 37(8): 779. DOI: [10.1360/aps040178](https://doi.org/10.1360/aps040178).
- [25] LIGGENSTOFFER A S, YOUSSEF N H, COUGER M B, et al. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum *Neocallimastigomycota*) in ruminant and non-ruminant herbivores[J]. The ISME Journal, 2010, 4(10): 1225. DOI: [10.1038/ismej.2010.49](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.49).
- [26] 陈辉. 果寡糖的生物学功能及其在养猪生产中的应用[J]. 广东饲料, 2018, 27(2): 30.
- [27] YOUSSEF N H, COUGER M B, STRUCHTEMEYER C G, et al. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(15): 4620. DOI: [10.1128/AEM.00821-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00821-13).
- [28] SOLOMON K V, HAITJEMA C H, HENSKE J K, et al. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes[J]. Science, 2016, 351(6278): 1192.
- [29] 李亚丹, 杨辉, 卢向阳, 等. 不同饲料饲养黄牛瘤胃厌氧真菌的多样性对比研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2371. DOI: [10.16213/j.cnki.scjas.2017.10.035](https://doi.org/10.16213/j.cnki.scjas.2017.10.035).
- [30] THEODOROU M K, LOWE S E, TRINCI A P. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi[J]. Biosystems, 1988, 21(3/4): 371. DOI: [10.1016/0303-2647\(88\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(88)90035-4).
- [31] WANG T Y, CHEN H L, LU M Y J, et al. Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4: 24. DOI: [10.1186/1754-6834-4-24](https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-24).

责任编辑: 何承刚