

玫瑰高原鳅肠道微生物多样性研究

刘妮 彭作刚

ANALYSIS OF INTESTINAL MICROORGANISMS IN *TRIPLOPHYSA ROSA* (TELEOSTEI, CYPRINIFORMES)

LIU Ni, PENG Zuo-Gang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.2019.169>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

城市景观水体中固氮微生物多样性及固氮活性检测

THE DIVERSITY OF DIAZOTROPH AND THE ACTIVITY OF NITROGEN FIXATION IN URBAN LANDSCAPE WATER

水生生物学报. 2019, 43(5): 1139–1146 <https://doi.org/10.7541/2019.134>

发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究

EFFECTS OF FERMENTED SOYBEAN MEAL ON THE GROWTH AND INTESTINAL HISTOLOGY AND MICROBIOTA OF JUVENILE LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

水生生物学报. 2018, 42(5): 919–928 <https://doi.org/10.7541/2018.113>

基于线粒体CO I 和16S rRNA基因序列比较分析东海带鱼群体遗传多样性

A COMPARATIVE ANALYSIS ON THE GENETIC DIVERSITY OF *TRICHIURUS LEPTURUS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 282–290 <https://doi.org/10.7541/2019.035>

转基因鲤鱼与对照鲤肠道微生物群落差异研究

COMPARISON BETWEEN THE INTESTINAL BACTERIAL COMMUNITIES OF THE TRANSGENIC COMMON CARP AND THE CONTROLS

水生生物学报. 2018, 42(2): 349–355 <https://doi.org/10.7541/2018.044>

基于Miseq测序技术分析黄颡鱼不同养殖模式下池塘微生物群落结构多样性

BACTERIAL DIVERSITY OF POND WATER AND SEDIMENT IN DIFFERENT CULTURE SYSTEMS OF YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*) REVEALED BY MISEQ SEQUENCING

水生生物学报. 2020, 44(4): 781–789 <https://doi.org/10.7541/2020.094>

饥饿及恢复喂食对日本医蛭肠道菌群多样性的影响

EFFECTS OF FASTING AND REFEEDING ON *HIRUDO NIPPONIA* INTESTINAL MICROFLORA DIVERSITY

水生生物学报. 2019, 43(3): 537–544 <https://doi.org/10.7541/2019.065>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.2019.169

玫瑰高原鳅肠道微生物多样性研究

刘妮 彭作刚

(西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 研究旨在分析玫瑰高原鳅(*Triplophysa rosa*)肠道微生物的结构组成和多样性, 探索其肠道微生物的潜在功能。提取了5尾玫瑰高原鳅的肠道总DNA, 运用Illumina Miseq平台对肠道微生物16S rRNA的V3—V4区进行了测序, 统计样品肠道微生物的操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)数量, 分析物种组成、丰度及Alpha多样性, 并预测肠道微生物的功能。结果显示, 玫瑰高原鳅的肠道微生物有19门、31纲、87目、146科、253属、320种、451个OTUs。在门水平上, 优势菌群为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes); 在属水平上, 优势菌群为气单胞菌属(*Aeromonas*)、爱德华菌属(*Edwardsiella*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)。功能预测表明, 肠道微生物编码的大多数基因与新陈代谢相关, 其中“碳水化合物运输和代谢”和“氨基酸转运与代谢”功能类群的相对丰度较高。玫瑰高原鳅肠道内微生物组成复杂, 其功能分析有助于理解肠道微生物对玫瑰高原鳅摄食的影响, 为进一步研究玫瑰高原鳅的食性提供了理论基础。

关键词: 玫瑰高原鳅; 肠道微生物; 16S rRNA; 多样性; 功能

中图分类号: Q346+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)01-0118-07



玫瑰高原鳅(*Triplophysa rosa*)^[1], 隶属于鲤形目(Cypriniformes), 条鳅科(Nemacheilidae), 高原鳅属(*Triplophysa*), 是一种小型鱼类。目前仅分布于重庆市武隆县梦冲塘, 属乌江水系, 是我国特有鱼类。玫瑰高原鳅常年栖息于地下暗河或溶洞中, 体表色素消失, 眼睛高度退化, 触须、鳍条等感觉器官高度发达。目前对玫瑰高原鳅的研究集中于新种描述^[1]、中枢神经系统组织学^[2]、视觉器官形态结构^[3]、体色白化遗传基础^[4]、能量代谢^[5]、系统演化^[6]、遗传多样性^[7]及保护遗传学^[8]等方面, 关于玫瑰高原鳅食性的研究未见报道。

鱼类生长所需要的能量来源于对食物的消化吸收^[9]。除了有效地捕获食物外, 提高消化效率、优化营养物质的摄取和吸收, 对鱼类的营养需求同样重要^[10]。肠道是鱼类重要的消化器官, 其内存在大量微生物, 所以也是一种特殊的生物生态位^[11]。营养代谢、同化是宿主与肠道微生物群在肠道中的协同过程^[12], 肠道微生物可以产生维生素、氨基酸、消化酶、多种生长因子及其他代谢产物, 从而

促进鱼类的生长以及其他生理过程^[13]。食性是影响肠道微生物的重要因素, 不同食性的鱼类, 肠道微生物存在很大差异^[14, 15]。因此, 肠道微生物的结构组成与宿主的食性息息相关^[16-19]。

Illumina Miseq测序技术具有通量高、数据完整性好、经济高效且快速的优点^[20], 已广泛应用于研究微生物群落结构。16S rRNA(16S ribosomal RNA)是编码原核生物核糖体小亚基的基因, 突变率小且分子大小适中, 是细菌系统分类学研究中最常用和最有用的分子标记。

本研究通过使用Illumina Miseq平台对玫瑰高原鳅肠道微生物16S rRNA的V3—V4区进行测序以对其进行多样性研究, 分析玫瑰高原鳅肠道菌群的结构及多样性, 为探索玫瑰高原鳅肠道菌群的作用、了解玫瑰高原鳅的消化特性等提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018年6月在重庆市武隆县梦冲塘采集玫瑰

收稿日期: 2019-08-05; 修订日期: 2020-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(31872204)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872204)]

作者简介: 刘妮(1995—), 女, 硕士研究生; 主要从事水生生物学研究。E-mail: liuni0217@163.com

通信作者: 彭作刚, 男, 博士, 研究员; 主要从事鱼类系统演化研究。E-mail: pzg@swu.edu.cn

高原鳅, 当天带回实验室。于无菌条件下解剖样本, 完整取出肠道, 置于2 mL离心管中, 液氮速冻后保存在-80℃冰箱中待用。解剖工具均经过灭菌处理。

1.2 实验方法

使用E.Z.N.A.[®] soil试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.), 按照说明书对样品进行总DNA提取, 使用NanoDrop2000对DNA浓度和纯度进行检测。针对16S rRNA基因的V3—V4区进行扩增, 所用引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')^[21], 扩增区域长度约450 bp。扩增体系为20 μL: 4 μL 5×FastPfu缓冲液, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL引物(5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu聚合酶, 10 ng DNA模板。PCR反应条件: 95℃预变性3min; 95℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸45s, 29个循环; 最后72℃终延伸10min。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。测序采用Illumina MiSeq测序平台进行双端测序。

1.3 数据分析

使用Trimmomatic软件对得到的原始序列进行质控, 使用FLASH软件进行拼接。使用UPARSE软件(version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>), 根据97%的相似度对序列进行OTU聚类, 并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用RDP classifier(version 2.2, <http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释, 比对Silva数据库(Release132, <http://www.arb-silva.de>), 统计每个样本的肠道微生物在界、门、纲等分类水平的组成。使用mothur软件(version 1.30.1, http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)计算香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Simpson index)、ACE指数(ACE index)、Chao1指数(Chao1 index)及覆盖率(Coverage), 评估肠道菌群的Alpha多样性。

使用PICRUST菌群代谢功能预测工具对OTU丰度表进行标准化, 然后通过每个OTU对应的Green Gene ID对比到COG库(Clusters of Orthologous Groups, 直系同源基因簇)和KEGG库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 京都基因与基因组百科全书), 获得OTU对应的COG家族信息和KO信息, 计算各COG的丰度和KO丰度。根据COG数据库的信息, 可以从eggNOG数据库中解析到各个COG的描述信息, 及其功能信息, 从而得到功能丰度谱; 根据KEGG数据库的信息, 可以获得KO、Pathway、EC信息, 并根据OTU丰度计算各功能类别的丰度。

2 结果

2.1 测序基本数据分析

采用Illumina Miseq测序平台对5尾样品的16S rRNA基因V3—V4区进行测序, 共得到有效序列218278条, 按97%相似度聚类后得到451个OTUs, 共鉴定出19门、31纲、87目、146科、253属、320种。

Alpha多样性是指一个特定区域或生态系统内的多样性, 是反映丰富度和均匀度的综合指标。该分析中, 香农指数、辛普森指数反映菌群的多样性, 香农指数值越高表明菌群的多样性越高, 辛普森指数值越低表明菌群的多样性越高; ACE指数、Chao1指数反映菌群的丰富度, ACE指数、Chao1指数值越高表明菌群物种的丰富度越高; Coverage值为测序深度指数, 其值越接近于1, 说明测序深度越合理。Alpha多样性分析结果表明: 5尾样品的丰富度与均匀度差异较大。样品TR2的香农指数、ACE指数、Chao1指数最高。5个样品的coverage值从0.998到1, 表明测序深度已基本覆盖到样品中所有的物种(表1)。

随着测序深度的不断增加, 稀释曲线趋于平缓, 表明本实验获得的数据可以反映玫瑰高原鳅肠道微生物的绝大部分信息(图1)。5尾样品共有的OTUs有10个, 样品TR3独有的OTUs最少, 仅有3个, 样品TR2独有的OTUs最多, 为151个(图2)。

2.2 玫瑰高原鳅肠道菌群整体结构分析

基于门分类水平上的玫瑰高原鳅肠道微生物多样性分析 高通量测序分析表明玫瑰高原鳅的肠道微生物主要由变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻细菌(Cyanobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、Patescibacteria、Epsilonbacteraeota、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、螺旋体门(Spirochaetes)等组成。在样品

表1 Alpha多样性统计

Tab. 1 The statistics of Alpha-diversity

样本编号 Sample number	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	ACE指数 ACE index	Chao1指数 Chao1 index	覆盖率 Coverage
TR1	0.823	0.725	115.433	121.100	0.999
TR2	1.505	0.626	268.554	272.875	1.000
TR3	1.169	0.478	124.584	89.750	0.999
TR4	0.868	0.668	184.968	186.000	0.998
TR5	0.325	0.919	208.514	198.232	0.999

注: TR为玫瑰高原鳅拉丁文名的缩写, 其后的数字表示样本编号

Note: TR. *Triplophysa rosa*, the number behind TR means sample number

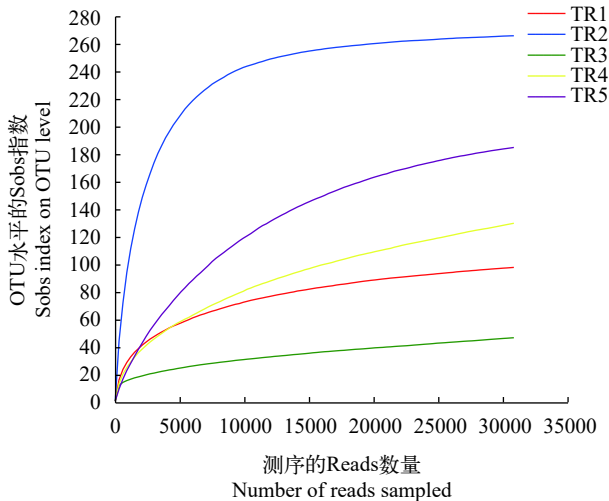


图1 样品的稀释曲线图

Fig. 1 The rarefaction curve of samples

TR1、TR2中,主要的菌门为变形菌门(93.61%和86.15%)以及少量的放线菌门(4.47%和2.07%)和拟杆菌门(1.01%和1%),此外,TR2中,还有3.28%的厚壁菌门;在TR3、TR4及TR5中,主要的菌门为变形菌门(98.67%、98.31%、97.28%)和少量的拟杆菌门(1.25%、1.15%、1.71%,图3)。

基于属分类水平上的玫瑰高原鳅肠道微生物多样性分析 在样品TR1中,主要的菌属为气单胞菌属(*Aeromonas*, 84.93%)、希瓦氏菌属(*Shewanella*, 5.06%)及*Paenarthrobacter* (3.85%);在样品TR2中,主要的菌属为邻单胞菌属(*Plesiomonas*, 79.09%)、罗尔斯通菌属(*Ralstonia*, 1.76%)及芽孢杆菌属(*Bacillus*, 1.76%);在样品TR3中,主要的菌

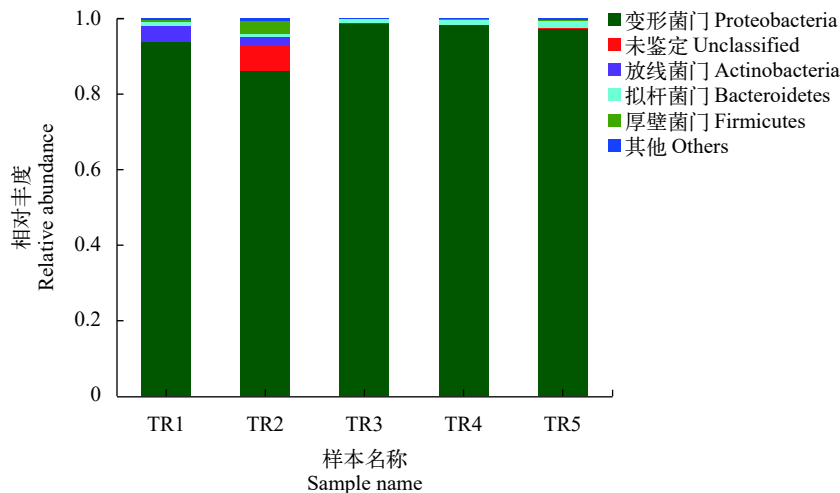


图3 基于门水平的玫瑰高原鳅肠道菌群结构

Fig. 3 Bacterial structure evaluated at the phylum taxonomical level in *T. rosa*

Proteobacteria. 变形菌门; Unclassified. 未鉴定; Actinobacteria. 放线菌门; Bacteroidetes. 拟杆菌门; Firmicutes. 厚壁菌门; Others. 其他丰度小于1%的菌群之和

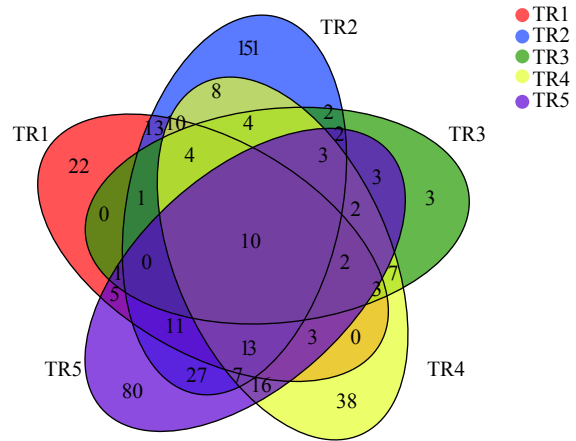


图2 各样本OTUs的韦恩图

Fig. 2 The venn diagram of each sample's OTUs
图中数字表示5个样本中共有的和独有的OTU数量
The number of common and unique OTU in 5 samples

属为气单胞菌属(65.72%)、希瓦氏菌属(22.34%)、弧菌属(*Vibrio*, 3.35%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 3.35%)及黄杆菌属(*Flavobacterium*, 1.24%);在样品TR4中,主要的菌属为气单胞菌属(81.11%)、希瓦氏菌属(4.24%)、弧菌属(8.98%)、黄杆菌属(1.07%)及不动杆菌属(*Acinetobacter*, 1.67%);在样品TR5中,主要的菌属为爱德华菌属(*Edwardsiella*, 95.87%)及黄杆菌属(1.4%,图4)。

2.3 功能预测

基于各样品KEGG比对获得的功能信息组成,共获得282个代谢功能途径。KEGG代谢通路表明:肠道微生物编码的大多数基因与新陈代谢相关,其次是与环境信息处理相关(表2)。COG功能分类统

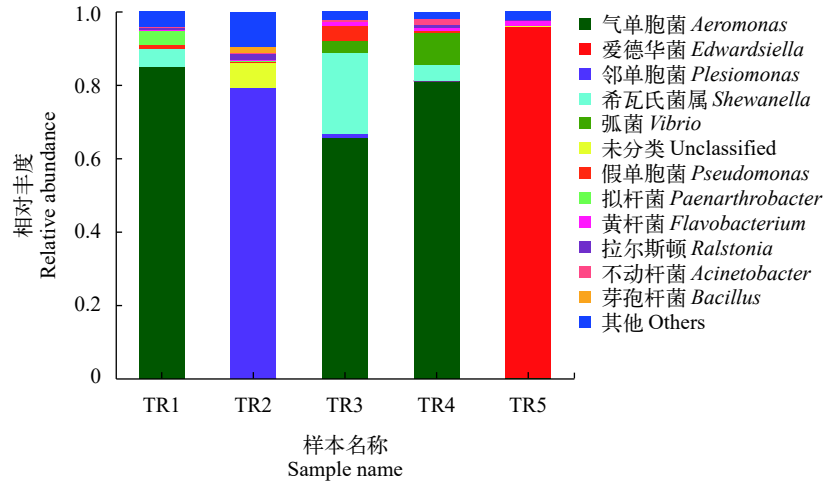


图 4 基于属水平的玫瑰高原鳅肠道菌群结构

Fig. 4 Bacterial structure evaluated at the genus taxonomical level in *T. rosa*

Aeromonas. 气单胞菌属; *Edwardsiella*. 爱德华菌属; *Plesiomonas*. 邻单胞菌属; *Shewanella*. 希瓦氏菌属; *Vibrio*. 弧菌属; *Unclassified*. 未鉴定; *Pseudomonas*. 假单胞菌属; *Paenarthrobacter*; *Flavobacterium*. 黄杆菌属; *Ralstonia*. 罗尔斯通菌属; *Acinetobacter*. 不动杆菌属; *Bacillus*. 芽孢杆菌属; *Others*. 其他

表 2 KEGG代谢通路统计

Tab. 2 Metabolic pathway statistics based on KEGG

编号 Number	功能Function	丰度 Abundance
1	新陈代谢Metabolism	45059885
2	环境信息处理Environmental information processing	17740636
3	遗传信息处理Genetic information processing	15714193
4	细胞进程Cellular processes	5518399
5	人类疾病;Human diseases	1146337
6	有机系统Organismal systems	672877
7	无None	195855

计结果表明: 菌群在“氨基酸转运与代谢”和“碳水化合物运输和代谢”功能类群的相对丰度较高(图 5)。

3 讨论

本研究对玫瑰高原鳅的肠道微生物多样性进行了分析。Alpha多样性分析结果中, 样品TR2的香农指数、ACE指数、Chao1指数最高, 说明该样品中菌群最丰富。另外, 5个样品的coverage指数平均值为0.999, 说明样品中物种没有被检测出的概率较低, 表明测序数据合理, 能够反映肠道微生物菌群的结构及组成的多样性。不过本研究中5尾玫瑰高原鳅的肠道菌群组成及数量存在差异, 而肠道菌群的多样性及丰度受诸多因素的影响, 如年龄、性别^[22, 23]、进食状态^[24, 25]、健康状态^[26]、应激反应^[27]等, 因此推测玫瑰高原鳅肠道菌群的差异与个体的生理状况有关。

本研究中变形菌门是玫瑰高原鳅肠道中丰度

最高的菌群, 其次是放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门, 这与非洲齿鲤(*Nothobranchius furzeri*)^[22]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[28]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[29]、金目鲈(*Lates calcarifer*)^[30]等的肠道菌群相似, 只是比例不同。典型洞穴鱼类墨西哥丽脂鲤(*Astyanax mexicanus*)肠道菌群也以变形菌门为主^[31]。变形菌门、放线菌门和拟杆菌门普遍存在于鱼类肠道^[32], 同时也是其他动物如加拿大马鹿(*Cervus canadensis*)和白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)^[33]、雉科鸟类^[34]、尖吻蝾(*Deinagkistrodon*)和*Ptyas mucosa*^[35]、瑞肇大小蠹(*Dendroctonus rhizophagus*)^[36]等物种肠道中的优势菌, 表明物种之间存在共享的核心微生物群^[33]。变形菌门的含量远远大于其他菌门, 为玫瑰高原鳅肠道中的绝对优势菌。变形菌门是细菌中最大的一门, 功能高度复杂, 广泛参与宿主的营养代谢^[37]。拟杆菌门可以帮助宿主降解碳水化合物、蛋白质和其他物质, 促进营养物质的吸收, 维持肠道稳态, 促进宿主免疫系统的发育^[38, 39]。厚壁菌门的物种丰富, 与碳水化合物代谢和吸收相关, 可以产生多种消化酶帮助宿主分解各种物质, 促进营养物质的吸收^[40]。

样品TR1、TR3和TR4的优势菌属为气单胞菌属, 属于变形菌门, 该属可以分泌与致病性及环境适应有关的酶, 如溶血性肠毒素、脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶^[41], 可以提高食物的消化率, 在消化过程中具有重要作用。玫瑰高原鳅常年生活在洞穴中, 食物匮乏, 具有良好的食物消化以及营养吸收能力对其生长发育极其重要。TR2中的优势菌属

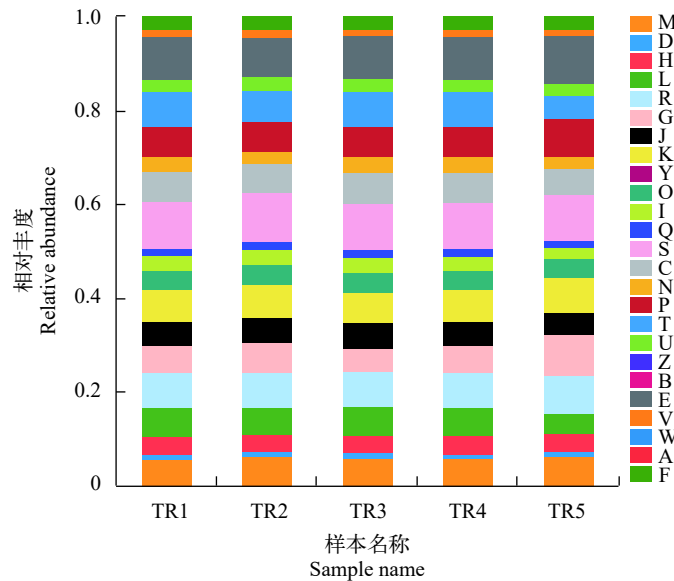


图5 玫瑰高原鳅肠道微生物的COG功能分类统计

Fig. 5 The COG function classification of intestinal microorganisms in *T. rosa*

A. RNA处理和修饰RNA processing and modification; B. 染色质结构与动力学Chromatin structure and dynamics; C. 能源生产与转化Energy production and conversion; D. 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E. 氨基酸转运与代谢Amino acid transport and metabolism; F. 核苷酸的转运和代谢Nucleotide transport and metabolism; G. 碳水化合物运输和代谢Carbohydrate transport and metabolism; H. 辅酶运输和代谢Coenzyme transport and metabolism; I. 脂质转运与代谢Lipid transport and metabolism; J. 翻译、核糖体结构和生物发生Translation, ribosomal structure and biogenesis; K. 转录终止Transcription termination; L. 复制、重组和修复Replication, recombination and repair; M. 细胞壁/膜/信封生源论Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N. 细胞运动Cell motility; O. 翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P. 无机离子运输与代谢Inorganic ion transport and metabolism; Q. 次生代谢产物的合成、运输和分解代谢Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R. 一般功能预测General function prediction only; S. 功能未知Function unknown; T. 信号转导机制Signal transduction mechanisms; U. 细胞内运输、分泌和囊泡运输Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V. 防御机制Defense mechanisms; W. 真核细胞的细胞外结构Extracellular structures; Y. 核结构Nuclear structure; Z. 细胞骨架Cytoskeleton

为邻单胞菌属, 菌种为类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*), TR5的优势菌属为爱德华菌属, 菌种为鲑鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*), 类志贺邻单胞菌和鲑鱼爱德华氏菌都是常见的重要水生致病菌, 在鱼体内会引起严重的肠道疾病^[16, 42], 这两种菌在样本中的高丰度可能与该样本的健康状况有关。这可能是采样过程中, 环境的突然改变破坏了鱼类肠道菌群的平衡状态, 导致产生细菌性疾病^[12]。

鱼类肠道菌群组成与食性相关, 如草食性鱼类肠道中主要以梭菌属(*Clostridium*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)和纤毛菌属(*Leptotrichia*)为主; 肉食性鱼类肠道中主要菌群是鲸杆菌属(*Cetobacterium*)和盐单胞菌属(*Halomonas*); 杂食性和滤食性鱼类肠道中主要菌群为梭菌属、鲸杆菌属和盐单胞菌属^[19]。本研究在玫瑰高原鳅的肠道中检测到了少量的柠檬酸杆菌属、盐单胞菌属和鲸杆菌属, 推测其食性为杂食性偏肉食性。

鱼类的肠道微生物被认为对宿主的生命活动有重要影响, 在宿主的营养、免疫、防御等方面发挥重要作用^[43-45]。本研究中菌群功能预测的结果

发现玫瑰高原鳅肠道中与碳水化合物代谢相关的菌群丰度最高, 其次是与氨基酸代谢相关的菌群, 表明玫瑰高原鳅的能量来源主要是纤维及蛋白质。此外还有丰度较高的与环境信息处理相关的菌群, 这可能与其特殊的洞穴生活环境有关。

参考文献:

- [1] Chen X Y, Yang J X. *Triplophysa rosa* sp. nov.: a new blind loach from China [J]. *Journal of Fish Biology*, 2005, **66**(3): 599-608.
- [2] Huang J, Peng Z G, Wang Z J. Comparison of the gross anatomy of the brains between *Triplophysa bleekeri* and *Triplophysa rosa* [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, **38**(3): 94-100. [黄静, 彭作刚, 王志坚. 贝氏高原鳅与玫瑰高原鳅脑大体解剖结构的比较 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2013, **38**(3): 94-100.]
- [3] Niu Y P. Comparative histological study of visual organs between *Triplophysa rosa* and *Triplophysa bleekeri* [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 19-35. [牛亚兵. 玫瑰高原鳅和贝氏高原鳅视觉器官比较组织学研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017: 19-35.]
- [4] Xiao Y Q. Genetic basis of the albinism in the cavefish

- Triplophysa rosa* [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 16-18. [肖颖琦. 玫瑰高原鳅体色白化的遗传学基础研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017: 16-18]
- [5] Shi C, Yao M, Lv X, *et al.* Body and organ metabolic rates of a cave fish, *Triplophysa rosa*: influence of light and ontogenetic variation [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2018, **188**(6): 947-955.
- [6] Wang J, Tang Q, Wang Z, *et al.* The complete mitogenome sequence of a cave loach *Triplophysa rosa* (Teleostei, Balitoridae, Nemacheilinae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, **23**(5): 366-368.
- [7] Zhao J, Zhao K, Peng Z. Development and characterization of eleven microsatellite markers for an endangered cavefish (*Triplophysa rosa* Chen and Yang, 2005) using 454 sequencing [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(5): 1056-1058.
- [8] Zhao J F. Conservation genetics of *Triplophysa rosa* (Teleostei: Cypriniformes) [D]. Chongqing: Southwest University, 2015: 27-32. [赵金凤. 玫瑰高原鳅保护遗传学研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015: 27-32]
- [9] Yin M C. Fish Ecology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 64-78 [殷名称. 鱼类生态学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 64-78.]
- [10] Baldo L, Pretus J L, Riera J L, *et al.* Convergence of gut microbiotas in the adaptive radiations of African cichlid fishes [J]. *The ISME Journal*, 2017, **11**(9): 1975-1987.
- [11] Blaser M J. The microbiome revolution [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2014, **124**(10): 4162-4165.
- [12] Nayak S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **41**(11): 1553-1573.
- [13] Cai B B. Diversity and function analysis of the intestine microbes of *Onychostoma sima* [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2017: 2. [蔡斌斌. 白甲鱼肠道微生物多样性及其功能分析 [D]. 福州: 福建师范大学, 2017: 2]
- [14] Li J, Ni J, Li J, *et al.* Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, **117**(6): 1750-1760.
- [15] Ward N L, Steven B, Penn K, *et al.* Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species [J]. *Extremophiles*, 2009, **13**(4): 679-685.
- [16] Yu E M, Zhang Z N, Xia Y, *et al.* Effects of different diets on intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(1): 118-126. [郁二蒙, 张振男, 夏耘, 等. 摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析 [J]. 水产学报, 2015, **39**(1): 118-126.]
- [17] Zhong L, Xiang J G, Zeng D, *et al.* Effects of different diets on intestinal microbiota of *Elopichthys bambusa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(4): 830-835. [钟蕾, 向建国, 曾丹, 等. 饵料对鳊肠道微生物多样性的影响 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(4): 830-835.]
- [18] Ley R E, Lozupone C A, Hamady M, *et al.* Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**(10): 776-788.
- [19] Liu H, Guo X, Gooneratne R, *et al.* The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 24340.
- [20] Pan Q, Shai O, Lee L J, *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. *Nature Genetics*, 2008, **40**(12): 1413-1415.
- [21] Xu N, Tan G, Wang H, *et al.* Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016(74): 1-8.
- [22] Smith P, Willemsen D, Popkes M, *et al.* Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish [J]. *eLife*, 2017(6): e27014.
- [23] Pařčo B, Sharma A K, Petrželková K J, *et al.* Gut microbiome composition of wild western lowland gorillas is associated with individual age and sex factors [J]. *American Journal of Physical Anthropology*, 2019, **169**(3): 575-585.
- [24] Shi P, Lu Z H, You H J, *et al.* Effects of fasting and refeeding on *Hirudo medicinalis* intestinal microflora diversity [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(3): 537-544. [石萍, 鲁增辉, 游华建, 等. 饥饿及恢复喂食对日本医蛭肠道菌群多样性的影响 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(3): 537-544.]
- [25] Mekuchi M, Asakura T, Sakata K, *et al.* Intestinal microbiota composition is altered according to nutritional biorhythms in the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(6): e0197256.
- [26] Xiong X Y, Wang X F, Peng Y H, *et al.* Variance analysis of intestinal bacterial community between healthy and diseased *Trachinotus ovatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(5): 1317-1325. [熊向英, 王贤丰, 彭银辉, 等. 健康和患病卵形鲳鲹肠道菌群结构的差异 [J]. 水产学报, 2019, **43**(5): 1317-1325.]
- [27] Sun Y, Zhang M, Chen C C, *et al.* Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammatory inhibition and transmissible enteritis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2013, **144**(7): 1478-1487.
- [28] Michl S C, Ratten J M, Beyer M, *et al.* The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(5): e0177735.
- [29] Dehler C E, Secombes C J, Martin S A M. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 13877.
- [30] Zheng X, Yang R, Hu J, *et al.* The gut microbiota community and antioxidant enzymes activity of barramundi reared at seawater and freshwater [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019(89): 127-131.
- [31] Ornelas-García P, Pajares S, Sosa-Jiménez V M, *et al.* Microbiome differences between river-dwelling and cave-adapted populations of the fish *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853) [J]. *PeerJ*, 2018, **6**(2): e5906.
- [32] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, *et al.* Evidence

- for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. *The ISME Journal*, 2011, **5**(10): 1595-1608.
- [33] Gruninger R J, Sensen C W, McAllister T A, *et al.* Diversity of rumen bacteria in Canadian cervids [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e89682.
- [34] Shen J B, Zhang X J, Wu W, *et al.* The gut microbes' diversity and function of Phasianidae provide insights on the adaptation to their diet [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2016, **39**(2): 90-95. [沈佳斌, 张雪敬, 吴蔚, 等. 雉科鸟类肠道微生物的多样性与功能及其对食性的适应 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2016, **39**(2): 90-95.]
- [35] Qin Z, Wang S, Guo D, *et al.* Comparative analysis of intestinal bacteria among venom secretion and non-secretion snakes [J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 6335.
- [36] Briones-Roblero C I, Hernández-García J A, Gonzalez-Escobedo R, *et al.* Structure and dynamics of the gut bacterial microbiota of the bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) across their life stages [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(4): e0175470.
- [37] Kersters K, Vos P D, Gillis M, *et al.* Introduction to the Proteobacteria [M]. New York: Springer, 2006: 3-37
- [38] Bäckhed F, Ding H, Wang T, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(44): 15718-15723.
- [39] Xiang Y, Wu G C. Some concepts of intestinal microbiota [J]. *Modern Medicine Health*, 2019, **35**(1): 5-7. [向毅, 巫贵成. 肠道微生态的基本概念 [J]. 现代医药卫生, 2019, **35**(1): 5-7.]
- [40] Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016(7): 1031.
- [41] Pemberton J M, Kidd S P, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **152**(1): 1-10.
- [42] Chen C Z. *Edwardsiella* and Edwardsiellasis of fish (Summary) [J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2004, **18**(3): 70-76. [陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病(综述) [J]. 河北科技师范学院学报, 2004, **18**(3): 70-76.]
- [43] Brugman S, Nieuwenhuis E E. Mucosal control of the intestinal microbial community [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2010, **88**(9): 881-888.
- [44] Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes [J]? *Nature Reviews Immunology*, 2010, **10**(10): 735-744.
- [45] Viney M E, Riley E M. From Immunology to Eco-immunology: More Than a New Name [M]. Netherlands: Springer, 2014: 1-13

ANALYSIS OF INTESTINAL MICROORGANISMS IN *TRIPLOPHYSA ROSA* (TELEOSTEI, CYPRINIFORMES)

LIU Ni and PENG Zuo-Gang

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education),
School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Triplophysa rosa* is a typical cave-dwelling fish distributed at Wulong County, Chongqing, China. It has degenerated eyes, albino skin, and highly developed sense organs, but its gut microbial function adapted to cave remains to be settled. The aims of this study were to analyze the structure and diversity of intestinal microorganisms in *T. rosa* and to explore the function of intestinal microorganisms. We extracted total intestinal DNA of 5 *T. rosa*, and then sequenced the V3—V4 region of 16S rRNA using Illumina Miseq sequencing technology. The number of operational taxonomic units (OTUs) of intestinal microorganisms was counted to analyze species composition, abundance, and Alpha diversity. The function of intestinal microorganisms was predicted by PICRUSt. A total of 451 OTUs of the high-quality sequences were obtained, belonging to 19 phyla, 31 classes, 87 orders, 146 families, 253 genera, and 320 species. At the phylum level, Proteobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes were the dominant microorganisms. At the genus level, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Plesiomonas*, and *Shewanella* were the main microorganisms. Functional prediction showed that most of the genes encoded by intestinal microorganisms are related to metabolism with the highest relationship with “amino acid transport and metabolism” and “carbohydrate transport and metabolism”. The composition of the microorganisms in the intestinal tract of *T. rosa* is complex, and functional analysis is helpful to understand the influence of intestinal microorganisms on its feeding, providing a theoretical basis for further study on fish diet.

Key words: *Triplophysa rosa*; Intestinal microorganisms; 16S rRNA; Diversity; Function