

# 太湖不同湖区真核微型浮游生物基因多样性的研究

陈美军<sup>1,2</sup>, 孔繁翔<sup>1\*</sup>, 陈非洲<sup>1</sup>, 邢鹏<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**用 DGGE (denatured gradient gel electrophoresis) 和构建 18S rDNA 克隆文库 2 种方法对太湖不同湖区的真核微型浮游生物 (0.8 ~ 20  $\mu\text{m}$ ) 多样性及组成结构进行了研究. DGGE 结果表明, 不同湖区真核微型浮游生物的 DGGE 指纹图谱存在明显差异, 其中营养水平较低的东太湖和贡湖 DGGE 条带数最多, 分别为 23 和 24, 香农多样性指数分别为 3.135 和 3.178, 而营养水平较高的梅梁湾和五里湖最少, 均为 18, 香农多样性指数为 2.890, 表明营养水平较低湖区的多样性高于营养水平较高的湖区. 克隆测序结果表明太湖中真核微型浮游生物种类丰富, 占优势的主要是一些鞭毛藻、异养鞭毛虫、纤毛虫和真菌, 而营养水平不同的梅梁湾、湖心、东太湖中真核微型浮游生物组成明显不同. 在营养水平较高的梅梁湾, 28.6% 的 OUT (operational taxonomic unit) 属于异养鞭毛虫, 另外隐藻、金藻分别占 22.9% 和 14.3%; 在湖心, 金藻的比例最大, 占 25.7%, 另外比较多的是异养鞭毛虫和隐藻, 分别为 20.0% 和 14.3%; 而营养水平较低的东太湖各类纤毛虫所占比例最大, 为 26.8%, 异养鞭毛虫较少, 仅占 4.9%, 另外真菌含量较高, 占 12.2%.

**关键词:**微食物网; 真核微型浮游生物; DGGE; 18S rDNA 克隆文库; 基因多样性

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0769-07

## Genetic Diversity of Eukaryotic Microplankton in Different Areas of Lake Taihu

CHEN Mei-jun<sup>1,2</sup>, KONG Fan-xiang<sup>1</sup>, CHEN Fei-zhou<sup>1</sup>, XING Peng<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The methods of DGGE and cloning/sequencing were used to study the diversity and community structures of small planktons (0.8 ~ 20  $\mu\text{m}$ ) in different areas of Lake Taihu. DGGE indicated that there were markedly various fingerprints in different areas and the diversities were higher in areas with low trophic status than those with relatively high trophic status. There were 23, 24 DGGE bands in East Taihu and Gonghu Bay, respectively (Shannon index were 3.135 and 3.178) and 18 bands in both Meiliang Bay and Wuli Bay (Both Shannon index were 2.890). The result of cloning/sequencing indicated that there was a high diversity of small planktons in Lake Taihu and most of them phototrophic flagellate, heterotrophic flagellate, ciliate and fungi. There were various community structures in the three different clone libraries. In Meiliang Bay, 28.6% OTUs (operational taxonomic unit) belonged to heterotrophic flagellate, followed by Cryptophyta (22.9%) and Chrysophyta (14.3%). In Central Lake, 25.7% OTUs belonged to Chrysophyta, followed by heterotrophic flagellate (20.0%) and Cryptophyta (14.3%). In East Taihu, ciliates were the dominant group and only a few heterotrophic flagellates (4.9%) were detected. In addition, fungi were relatively abundant (12.2%) in this area.

**Key words:** microbial food web; eukaryotic microplankton; DGGE; 18S rDNA cloning library; genetic diversity

自 1983 年 Azam 提出微食物环 (micro food loop) 的概念后, 有关微食物网的研究得到广泛关注<sup>[1]</sup>. 真核微型浮游生物 (0.8 ~ 20  $\mu\text{m}$ ) 虽然个体微小, 但却是微食物网的重要组成部分, 具有很高的丰度<sup>[2]</sup>, 在水生态系统中的物质循环和能量流动中起到重要的作用<sup>[3]</sup>. 搞清楚这个群落的结构多样性及它们代表的功能多样性, 有助于更好地理解自然水体中微食物网的结构和功能.

尽管研究者已经意识到真核微型浮游生物的重要作用, 但是对这个群落的结构及物种组成仍知之甚少<sup>[2]</sup>, 主要是因为微型浮游生物普遍缺乏明显的形态特征, 而且其中有些不易保存, 限制了传统形态学分类方法的使用<sup>[4]</sup>. 最近 10 a 来, 人们开始从分子角度对其进行研究<sup>[5-7]</sup>. 但此类研究主要集中在

海洋生态系统和贫营养型淡水湖泊中<sup>[3,8]</sup>, 有关富营养化浅水湖泊真核微型浮游生物多样性的分析及其环境影响的报道并不多.

DGGE 和构建克隆文库是目前研究微食物网结构常用的分子手段, 它们都以 PCR 为基础, 已经有效地应用于分析不同环境中细菌和古细菌的多样性<sup>[9,10]</sup>. 目前仅有少数学者把这 2 种方法用于真核原生物群落的研究<sup>[4,8,11]</sup>. 研究表明 DGGE 和构建克隆文库能有效地评价水生态系统原生物群落的

收稿日期: 2007-04-23; 修订日期: 2007-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40671068, 30600069); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB412300)

作者简介: 陈美军 (1977 ~ ), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: meijunch@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: fxxkong@niglas.ac.cn

基因多样性,比较不同时空不同生境的样品,通过测序并在公共数据库 Genebank 里进行 BLAST,对群落的成员进行分子鉴定.

目前有关太湖的微食物网研究,主要偏向于细菌的多样性和一些常见浮游生物的定量研究<sup>[12~14]</sup>,针对真核微型浮游生物的多样性及其生物组成结构的研究尚鲜见报道.本研究通过 PCR-DGGE,及构建 18S rDNA 全长序列克隆文库的方法,分析了大型浅水湖泊-太湖不同营养水平湖区中真核微型浮游生物的多样性及其生物组成,以期为进一步探讨真核微型浮游生物在微食物网及水生态系统中的功能提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 采样点和方法

2006 年 11 月分别在梅梁湾、湖心、贡湖、五里湖、西太湖、东太湖采样,采样点如图 1.取表层和底层混合水,用 20  $\mu\text{m}$  的筛网预过滤,去除大的浮游动物和藻类.然后抽滤到 0.8  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜上,每个样品过滤约 200 mL 湖水,在基因组 DNA 提取前,滤膜放于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存.样品常规理化指标按标准方法测定<sup>[15]</sup>.

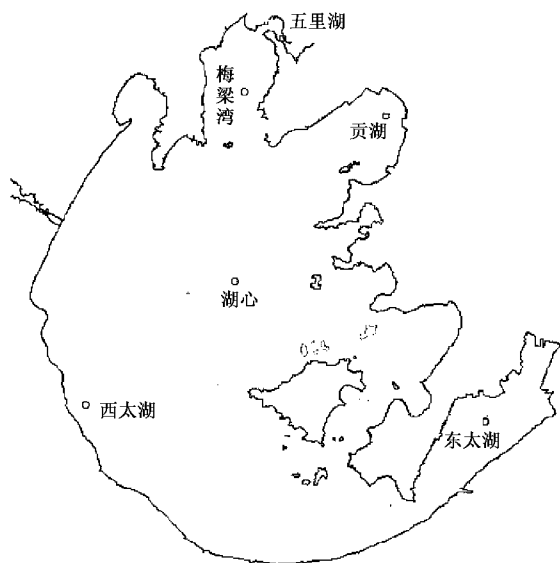


图 1 太湖采样点分布

Fig.1 Sampling sites in Lake Taihu

### 1.2 环境基因组提取

基因组提取方法参考文献<sup>[16]</sup>,结合化学裂解和物理破碎的方法,并进行了改进.把聚集有样品的 0.8  $\mu\text{m}$  聚碳酸酯膜剪碎,加入 1 mL 预热到  $70^{\circ}\text{C}$  的  $2\times$  裂解液<sup>[100 mmol/L Tris (pH 8.0), 40 mmol/L</sup>

EDTA, 100 mmol/L NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate],加入 0.5 g 玻璃珠(直径为 0.5 mm, BioSpec 产品),在 Mini-Bead-Beater 上振荡 30 s,频率为 2 500 r/min;然后  $70^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,涡旋 1 min,此步骤重复 2 次;冰浴 5 min,加入 140  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaCl 到终浓度 0.7 mol/L,127  $\mu\text{L}$  10% 的 CTAB 到终浓度 1%; $70^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min;用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比,下同)和氯仿:异戊醇(24:1)依次抽提 1 次;将上清移入干净 2 mL 离心管,用等体积预冷的异丙醇沉淀 DNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  0.5 h,15 000 g 离心 10 min,弃上清;沉淀用 70% 的酒精洗 1 次,15 000 g 离心 10 min,弃上清;空气中自然干燥后加入 50  $\mu\text{L}$  双蒸水重悬 DNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用.

### 1.3 DGGE

PCR 扩增:用真核生物的通用引物,上游引物为 Euk1A: 5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3',下游引物为 Euk516rGC: 5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGACGCGGGGACCAGACTTGCCCTCC-3',片断长度约 560 bp<sup>[4]</sup>.50  $\mu\text{L}$  的反应体系,其组分为: ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  PCR buffer (不含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol  $\text{MgCl}_2$  溶液 4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol dNTP 1  $\mu\text{L}$ , 10 pmol 的上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ),模板 1~10 ng.运行条件为: $4^{\circ}\text{C}$ ,预变性 130 s,然后 35 个循环的  $94^{\circ}\text{C}$ ,变性 30 s, $56^{\circ}\text{C}$ ,复性 30 s, $72^{\circ}\text{C}$  延伸 130 s,最后  $72^{\circ}\text{C}$  10 min.取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测.

DGGE 电泳用 CBS-DGGE2001(CBS 产品,美国).厚度为 1 mm,聚丙烯酰胺变性梯度为 30%~60% (100% 变性定义为 7 mol/L 的尿素,40% 的去离子甲酰胺),每个泳道加 800 ng 左右的 PCR 产物.电泳条件为: $60^{\circ}\text{C}$ ,电压 100 V,16 h,1 $\times$  TAE 电泳缓冲液(40 mmol/L Tris, 20 mmol/L 冰醋酸,1 mmol/L EDTA, pH 7.4).电泳完成后 DGGE 胶用 SYBR Green I 染色 20 min,用 Omega 凝胶成像系统分析.DGGE 条带用 Gel-pro 4.0 图像软件分析,然后手动修改.各湖区的生物多样性用香农多样性指数(Shannon index)评价.

### 1.4 18S rDNA 全长序列克隆库的构建与筛选

营养水平明显不同的梅梁湾,湖心及东太湖分别建 1 个 18S rDNA 全长序列的克隆文库.用真核生物的通过引物 Primer A: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3', Primer B: 5'-GATCCTTCTGCA GGTTCACCTAC-3'扩增 18S rDNA 全长序列,共 1 780 bp<sup>[17]</sup>.50  $\mu\text{L}$  的反应体系,其组分为: ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  PCR buffer (不含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol  $\text{MgCl}_2$  溶

液 4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol dNTP1  $\mu\text{L}$ , 10 pmol 的上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 0.4  $\mu\text{L}$  Ex *Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 模板 1 ~ 10 ng. 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 预变性 2 min, 然后 35 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ , 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ , 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2.5 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min. PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖电泳检测, 琼脂糖割胶纯化 PCR 产物, 用 TA 克隆试剂盒 pGEM-T Easy vector system I (Promega 产品) 建克隆文库. 先用蓝白斑法筛选阳性克隆, 每个克隆文库挑取 100 个左右的白斑, 再用测序引物 M13F、M13R 进行菌落 PCR 验证.

1.5 RFLP 分析和测序

用测序引物 M13F、M13R 扩增阳性克隆子中所插入的 18S rDNA 全长序列, 用限制性内切酶 *Hae* III (TaKaRa 产品) 酶切. 体系为 10  $\mu\text{L}$ , 组分是 DNA

6  $\mu\text{L}$ , *Hae* III 0.15  $\mu\text{L}$  (10 U/ $\mu\text{L}$ ), 10  $\times$  缓冲液 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 1.85  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  4 h. 酶切产物用 3% 的琼脂糖, 60 V, 电泳 3 h, SYBR Green I 染色 30 min, 分析各个克隆子插入片断的 RFLP 电泳模式. 相同 RFLP 模式认为同一 OTU, 每个 OTU 至少选 1 个克隆子部分测序. 计算覆盖率 (coverage value) = 1 - ( $N_c/N$ ), 其中  $N_c$  代表克隆库中 OTU 数, 而  $N$  代表总共分析的阳性克隆子数目.

2 结果与分析

2.1 太湖不同湖区理化参数

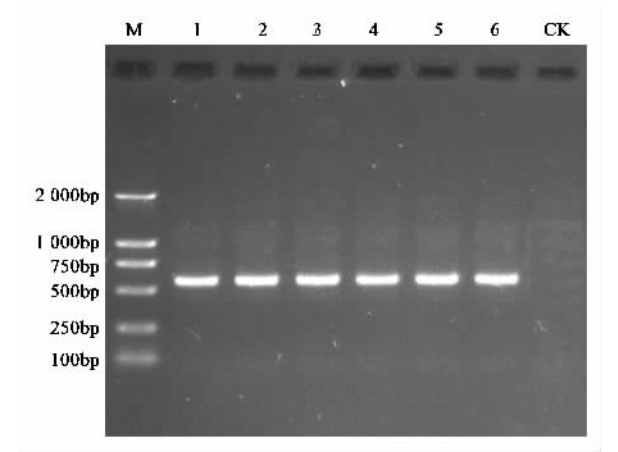
从表 1 可以看出, 各个湖区处于不同的营养水平, 其中营养水平相对较高的是梅梁湾, 而东太湖的营养水平在 6 个湖区中最低, 湖心悬浮质含量最高.

表 1 太湖不同湖区理化参数(2006-11)

| Table 1 Physicochemical parameters in the different areas of Lake Taihu (2006-11) |                   |                       |                       |                                      |                                        |                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|------|
| 湖区                                                                                | 采样点坐标             | TP/mg·L <sup>-1</sup> | TN/mg·L <sup>-1</sup> | BOD <sub>5</sub> /mg·L <sup>-1</sup> | Chla / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | SS/mg·L <sup>-1</sup> | SD/m |
| 梅梁湾                                                                               | 31°47'N, 120°19'E | 0.142                 | 3.20                  | 3.25                                 | 13.40                                  | 124.75                | 0.18 |
| 湖心                                                                                | 31°24'N, 120°17'E | 0.098                 | 1.35                  | 0.98                                 | 3.36                                   | 168.50                | 0.20 |
| 贡湖                                                                                | 31°43'N, 120°37'E | 0.059                 | 1.97                  | 1.40                                 | 8.47                                   | 44.80                 | 0.33 |
| 五里湖                                                                               | 31°52'N, 120°23'E | 0.086                 | 3.33                  | 1.84                                 | 9.37                                   | 53.90                 | 0.23 |
| 西太湖                                                                               | 31°10'N, 119°96'E | 0.100                 | 1.89                  | 1.74                                 | 22.30                                  | 57.36                 | 0.28 |
| 东太湖                                                                               | 31°08'N, 120°51'E | 0.026                 | 1.24                  | 1.14                                 | 5.81                                   | 15.50                 | 0.80 |

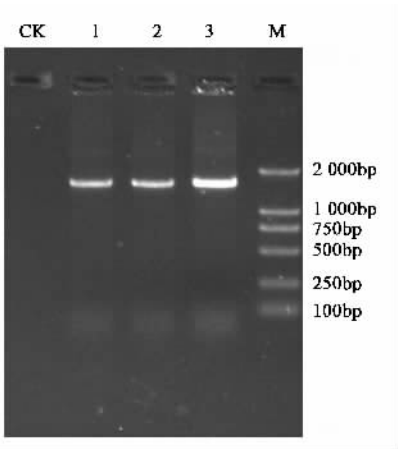
2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增结果

基因组总 DNA 的提取方法参考文献[16]并进行了改进, 结合化学裂解及物理破碎, 最终得到了较完整基因组 DNA. 用于 DGGE 分析的 18S rDNA 可变区片断的 PCR 扩增和用于构建克隆文库的 18S rDNA 全长序列扩增都获得了满意的结果, 效率高, 特异性好, 能用于进一步的分析, 见图 2 和图 3.



1: 梅梁湾 2: 湖心 3: 贡湖  
4: 五里湖 5: 西太湖 6: 东太湖  
图 2 18S rDNA 可变区片断扩增(560 bp)

Fig.2 PCR amplification of variable region of 18S rDNA



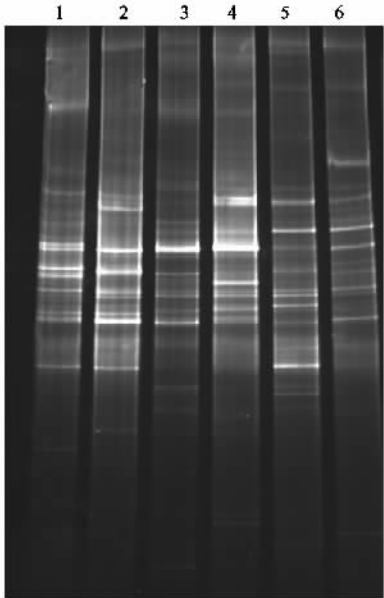
1: 梅梁湾 2: 湖心 3: 东太湖  
图 3 18S rDNA 全长片断扩增(1780 bp)

Fig.3 PCR amplification of complete 18S rDNA

2.3 DGGE 指纹图谱分析

DGGE 指纹图谱中的条带先经 Gel-pro 4.0 图像软件分析, 然后手工校对. 从图 4 可以看出, 每个样品的泳道中都有较多条带, 且不同湖区样品的 DGGE 条带组成存在明显的差异. 6 个湖区中, 以营养水平较低的东太湖和贡湖的 DGGE 条带数最多, 分别为 23、24 条, 说明这 2 个湖区优势物种数分别

为 23、24 左右, 香农多样性指数分别为 3.135、3.178. 而营养水平较高的梅梁湾和五里湖条带数最少, 均为 18 条, 说明优势物种为 18 种左右, 香农多样性指数为 2.890. 另外, 位于开敞区的湖心有 19 个条带, 而西太湖则有 22 个条带(图 4, 表 2). 聚类分析结果显示, 梅梁湾、五里湖和贡湖的真核微型浮游生物的组成较为接近, 特别是距离较近且营养水平都较高的梅梁湾和五里湖的生物组成最为相似, 而东太湖和西太湖虽然相距较远, 但其真核微型浮游生物的组成在 6 个湖区中最为相近(图 5).



1: 东太湖 2: 西太湖 3: 五里湖  
4: 贡湖 5: 湖心 6: 梅梁湾

图 4 DGGE 凝胶电泳图像

Fig. 4 DGGE patterns of different samples

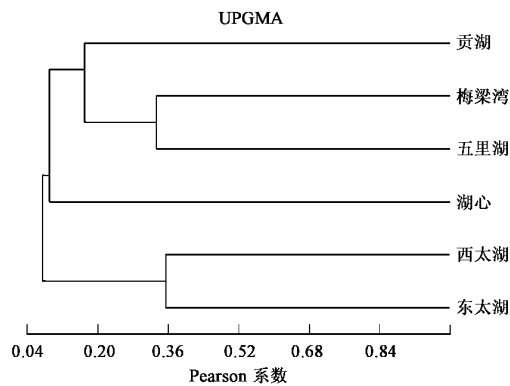


图 5 样品的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of samples

2.4 克隆文库的构建与筛选

在营养水平不同的梅梁湾、湖心、东太湖这 3 个

湖区各建立 1 个 18S rDNA 全长序列克隆文库, 每个克隆文库挑取了 100 个左右白斑, 然后用测序引物 M13F、M13R 进行菌落 PCR 验证. 结果梅梁湾共获得 85 个有正确插入片断的阳性克隆子, 湖心共获得 90 个阳性克隆子, 而东太湖共获得 95 个阳性克隆子(表 2).

表 2 DGGE 指纹图谱和 RFLP 分析

| Table 2 Analysis of DGGE patterns and RFLP patterns |          |         |        |       |       |
|-----------------------------------------------------|----------|---------|--------|-------|-------|
| 湖区                                                  | DGGE 条带数 | 香农多样性指数 | 阳性克隆子数 | OTU 数 | 覆盖率 % |
| 梅梁湾                                                 | 18       | 2.890   | 85     | 35    | 58.8  |
| 湖心                                                  | 19       | 2.944   | 90     | 35    | 61.1  |
| 贡湖                                                  | 24       | 3.178   | /      | /     | /     |
| 五里湖                                                 | 18       | 2.890   | /      | /     | /     |
| 西太湖                                                 | 22       | 3.091   | /      | /     | /     |
| 东太湖                                                 | 23       | 3.135   | 95     | 41    | 56.8  |

2.5 RFLP 分析与测序结果

用测序引物 M13F、M13R 扩增 270 个阳性克隆子中插入的 18S rDNA 全长序列, 利用限制性内切酶 *Hae* III 进行酶切, 部分阳性克隆子的 RFLP 电泳模式见图 6. 各样品的 18S rDNA 全长序列存在丰富的 RFLP 型, 从图 6 可以看出, 第 3、4 泳道 RFLP 型相同, 可认为同一 OTU, 而其它泳道 RFLP 型各不相同, 所以认为是不同的 OTU. 最后梅梁湾有 35 个 RFLP 型不同 OUT, 覆盖率为 58.8%, 湖心有 35 个 RFLP 型不同 OUT, 覆盖率为 61.1%, 东太湖最多, 有 41 个 RFLP 型不同个 OUT, 覆盖率为 56.8%(表 2).

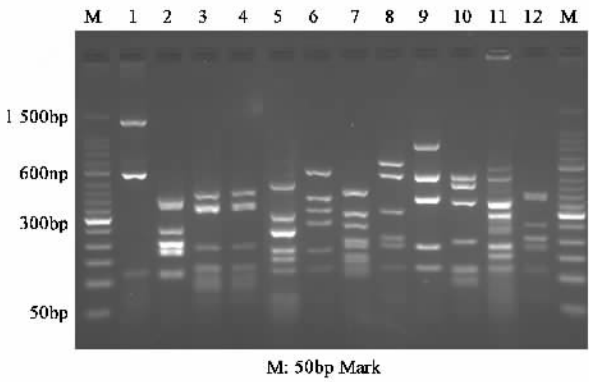


图 6 部分阳性克隆子的 RFLP 模式图

Fig. 6 RFLP patterns of some positive clones

3 个克隆文库共获得 111 个有效的 OTU, 每个 OTU 至少选 1 个克隆子进行部分测序(约 800 bp), 所得序列在 Genebank 里进行 BLAST. BLAST 结果表明, 太湖中微型浮游生物种类丰富, 包括隐藻、金藻、绿藻、硅藻、裸藻、真菌、纤毛虫、异养鞭毛虫及其他一些原生动物, 其中占优势的是隐藻、金藻、纤毛虫、

异养鞭毛虫和真菌. 隐藻的主要种类为: *Goniomonas* sp.、*Komma caudata*、*Chroomonas nordstedtii*, 另有 1 种未知的隐藻数量较多; 金藻的主要种类为: *Ochromonas tuberculata*、*Chromulina chionophila*、*Mallomonas akrokomos*; 纤毛虫主要种类为: *Rimostrombidium lacustris*、*Parastrombidinopsis shimi*、*Parastrombidinopsis minima*、*Halteria grandinella*、*Strobilidium caudatum*; 异养鞭毛虫主要种类为: *Spumella* sp.、*Cryothecomonas longipes*、*Cryothecomonas aestivalis*、*Protaspis grandis*; 真菌的主要种类为: *Triparticalcar arcticum*、*Taphrina johansonii*、*Allomyces macrogynus*, 另外还有 1 种未知真菌数量较多(表 3).

表 3 部分优势种的序列分析

| Table 3 Sequence analysis of dominated species |                                   |          |       |
|------------------------------------------------|-----------------------------------|----------|-------|
| 类群                                             | 相似序列                              | 相似序列收录号  | 相似度 % |
| 隐藻                                             | <i>Goniomonas</i> sp. SH-1        | AY360455 | 93    |
|                                                | <i>Komma caudata</i>              | U53122   | 99    |
|                                                | <i>Chroomonas nordstedtii</i>     | AF508269 | 92    |
|                                                | Uncultured cryptophyte            | DQ244012 | 99    |
| 金藻                                             | <i>Ochromonas tuberculata</i>     | AF123293 | 97    |
|                                                | <i>Chromulina chionophila</i>     | M87332   | 97    |
|                                                | <i>Mallomonas akrokomos</i>       | U73229   | 94    |
| 纤毛虫                                            | <i>Rimostrombidium lacustris</i>  | DQ986131 | 97    |
|                                                | <i>Parastrombidinopsis shimi</i>  | AJ786648 | 94    |
|                                                | <i>Parastrombidinopsis minima</i> | DQ393786 | 95    |
|                                                | <i>Halteria grandinella</i>       | AF194410 | 97,   |
|                                                | <i>Strobilidium caudatum</i>      | AY143573 | 97    |
| 异养鞭毛虫                                          | <i>Spumella</i> sp. GOT220        | EF027354 | 98    |
|                                                | <i>Cryothecomonas longipes</i>    | AF290540 | 95    |
|                                                | <i>Cryothecomonas aestivalis</i>  | AF290539 | 95    |
|                                                | <i>Protaspis grandis</i>          | DQ303924 | 93    |
| 真菌                                             | <i>Triparticalcar arcticum</i>    | DQ536480 | 93    |
|                                                | <i>Taphrina johansonii</i>        | AJ495835 | 95    |
|                                                | <i>Allomyces macrogynus</i>       | U23936   | 94    |
|                                                | Uncultured fungus                 | DQ244011 | 95    |

从图 7 可以看出,富营养化程度不同的梅梁湾,湖心,东太湖各湖区中真核微型浮游生物组成明显不同.在湾心,28.60%的 OTU 属于异养鞭毛虫,另外隐藻,金藻分别占了 22.9%和 14.3%.湖心的金藻比例最大,占了 25.7%,而异养鞭毛虫和隐藻,分别为 20.0%和 14.3%.东太湖明显不同于前 2 个湖区,其中纤毛虫所占比份最大,为 26.8%,异养鞭毛虫较少,仅占 4.9%,而真菌含量较高,占了 12.2%.

3 讨论

DGGE 和构建克隆文库是 2 种比较常用分子生态学方法,过去主要用于研究细菌,现在人们已经将这种方法用于微型真核生物的研究. DGGE 是检测微生物多样性的一种快速可靠的方法,其带谱中条带的数量和亮度,可相应地反映环境样品中微生物物种的数量和优势种群<sup>[18]</sup>.此方法的优点是可以同时对大量不同的环境样品进行比较分析,缺点是不知道样品中具体的生物组成,即使结合优势条带的克隆测序,也只能反映优势物种及其相对含量<sup>[16]</sup>.

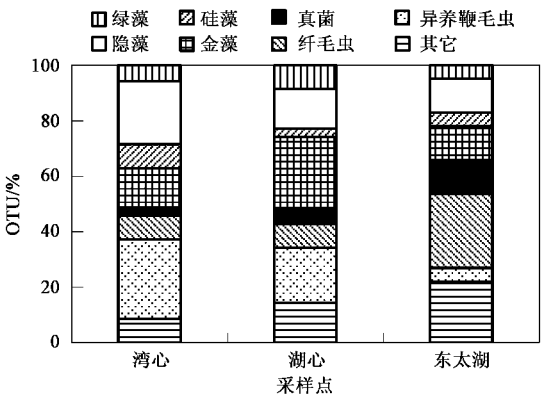


图 7 18S rDNA 克隆文库中各主要类群所占总 OTU 的比例  
Fig.7 Relative abundance of OTUs within the most represented phylogenetic groups in the three genetic libraries

而构建 18S rDNA 克隆文库,通过测序及上网比对,能够知道样品中主要的物种组成与相对丰度.结合 2 种方法,能够扬长避短,即可以用 DGGE 方法比较大来自不同时空的环境样品,也可以将具有类似 DGGE 指纹图谱的样品建立克隆文库,了解环境

中的主要生物组成<sup>[19]</sup>。

营养水平是影响微型浮游生物结构组成的主要因子之一<sup>[20]</sup>,本研究结合 2 种方法发现,太湖不同营养水平湖区的真核微型浮游生物多样性及组成明显不同,其中营养水平较低的东太湖的多样性明显高于营养水平较高的梅梁湾,类似的现象在大型浮游动物中也有所表现<sup>[21]</sup>。测序结果表明,太湖占优势的微型浮游生物主要是一些鞭毛藻、异养鞭毛虫、纤毛虫、及真菌。鞭毛藻主要包括隐藻和金藻,太湖藻类长期变化数据说明,随着营养水平的提高,隐藻的优势度会增加<sup>[22]</sup>,本研究的结果也表明营养水平高的梅梁湾微型隐藻多于另外 2 个湖区。

Auer 等<sup>[23]</sup>发现异养鞭毛虫的组成受营养水平的影响较小,但 Basu 等<sup>[24]</sup>发现异养鞭毛虫的丰度与总磷浓度显著相关。本研究发现不同营养水平湖区异养鞭毛虫(0.8~20  $\mu\text{m}$ )的组成和丰度存在明显差异。营养水平较高的梅梁湾的异养鞭毛虫种类最多,占了 OTU 总数的 28.6%,湖心次之,占了 20.0%,而东太湖最少,只有 4.9%属于异养鞭毛虫。可能原因在于梅梁湾营养水平较高,所以细菌丰富,给异养鞭毛虫提供了丰富的食物。

纤毛虫在东太湖最多,占了 26.8%,而在另 2 个湖区只有 8.6%。纤毛虫的丰度主要受食物的影响,但它的群落组成也受浮游甲壳动物的影响<sup>[25,26]</sup>。梅梁湾、湖心和东太湖浮游甲壳动物的密度分别为 168.0、69.3 和 10.7 个/L。营养水平较低的东太湖浮游甲壳动物数量较少,对于纤毛虫的捕食压力小,这可能是东太湖纤毛虫数量和种类比其它 2 个湖区多的原因。

水生生态系统中存在种类繁多的真菌,以往的研究可能一直把这些真菌的游动孢子误认为是异养鞭毛虫<sup>[27]</sup>。本研究发现 3 个不同营养水平的湖区都存在真菌,其中东太湖最多,占了 OTU 数的 12.2%,湖心次之,占了 5.7%,而梅梁湾最少,仅有 2.9%。Rankovic 等<sup>[28]</sup>研究发现有大型水草的区域真菌的种类多于没有水草的区域,Luo 等<sup>[29]</sup>调查了滇池和抚仙湖湖水中基质(木头和水草)上的真菌,发现低营养水平的抚仙湖真菌多样性高于高营养水平的滇池。东太湖营养水平较低,水质较好,湖底水草茂盛,提供了真菌生长的附着基质,可能这是东太湖真菌数量和种类比较丰富的原因。

## 4 结论

(1) 太湖中真核微型浮游生物多样性较高,营

养水平不同的各湖区生物多样性及组成差异显著,其中营养水平较低湖区的多样性高于营养水平较高的湖区。

(2) 太湖中占优势的真核微型浮游生物主要是一些鞭毛藻、异养鞭毛虫、纤毛虫和真菌。营养水平较高的梅梁湾真核微型浮游生物主要以异养鞭毛虫(28.60%)、隐藻(22.9%)和金藻(14.3%)为主。湖心的金藻比例最大,占了 OTU 数的 25.7%,异养鞭毛虫和隐藻分别占 20.0%和 14.3%。营养水平较低的东太湖占优势的是各类纤毛虫,占了 26.8%,而异养鞭毛虫较少,仅占 4.9%,另外在各个湖区中都发现有水生真菌存在,其中以东太湖最多,占了 12.2%。

## 参考文献:

- [1] Azam F, Fenchel T, Field J G, *et al.* The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1983, **10**: 257-263.
- [2] Caron D A, Gast R J, Lim E L, *et al.* Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions [J]. *Hydrobiologia*, 1999, **401**: 215-227.
- [3] Baretta-Bekker J G, Baretta J W, Hansen A S, *et al.* An improved model of carbon and nutrient dynamics in the microbial food web in marine enclosures [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, **14**: 91-108.
- [4] Diez B, Pedros-Alio C, Marsh T L, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(7): 2942-2951.
- [5] López G P, Rodríguez V F, Pedros A C, *et al.* Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton [J]. *Nature*, 2001, **409**: 603-607.
- [6] Der-Staay S Y M, De Wachter R, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity [J]. *Nature*, 2001, **409**: 607-610.
- [7] Romari K, Vaulot D. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences [J]. *Limnology and Oceanography*, 2004, **49**: 784-798.
- [8] Richards T A, Veprikitskiy A A, Gouliamova D E, *et al.* The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(9): 1413-1425.
- [9] Ogino A, Koshikawa H, Nakahara T, *et al.* Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses [J]. *Applied Microbiology*, 2001, **91**: 625-635.
- [10] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean [J]. *Applied*

- and Environmental Microbiology, 2002, **68**: 505-518.
- [11] Massana R, Guillou L, Diez B, *et al.* Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(9): 4554-4558.
- [12] Xing P, Kong F X, Cao H S, *et al.* Variations of bacterioplankton community during *Microcystis* spp. Blooms in a shallow eutrophic lake [J]. Journal of Freshwater Ecology, 2007, **22**(1): 61-67.
- [13] Wu Q L, Chen Y W, Xu K D, *et al.* Intrahabitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China [J]. Hydrobiologia, 2007, **581**(1): 241-254.
- [14] Gao G, Qin B Q, Ruben S. *et al.* The bacterioplankton of Lake Taihu, China: abundance, biomass, and production [J]. Hydrobiologia, 2007, **581**(1): 177-188.
- [15] 金相烂, 屠春瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. (第二版). 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 143-27.
- [16] Gast R J, Dennett M R, Caron D A. Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**(4): 2028-2037.
- [17] Medlin L K, Elwood H J, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions [J]. Gene, 1988, **71**: 491-499.
- [18] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, *et al.* Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns [J]. Environmental Microbiology, 2002, **4**(11): 634-643.
- [19] Stoeck T, Hayward B, Taylor G T, *et al.* A multiple PCR-primer approach to access the micro eukaryotic diversity in environmental samples [J]. Protist, 2006, **157**: 31-43.
- [20] Lepère C, Boucher D, Jardillier L, *et al.* Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a Lacustrine ecosystem (Lake Pavin) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(4): 2971-2981.
- [21] 谢平, 诸葛燕, 戴莽, 等. 水体富营养化对浮游生物群落多样性的影响[J]. 水生生物学报, 1996, **20**(增刊): 30-37.
- [22] 周万平, 陈伟民. 太湖浮游植物组成与演化及其环境响应[A]. 见: 秦伯强, 胡维平, 陈雄民, 等. 太湖水环境演化过程与机理[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 255-265.
- [23] Auer B, Arndt H. Taxonomic composition and biomass of heterotrophic flagellates in relation to lake trophy and season [J]. Freshwater Biology, 2001, **46**: 959-972.
- [24] Basu B K, Pick F R. Factors related to heterotrophic bacterial and flagellate abundance in temperate lakes [J]. Aquatic Microbial Ecology, 1997, **12**: 123-129.
- [25] Wiackowski K, Ventelä A M, Moilanen M, *et al.* What factors control planktonic ciliates during summer in a highly eutrophic lake? [J]. Hydrobiology, 2001, **443**(1-3): 43-57.
- [26] Jack J D, Gilbert J J. Susceptibilities of different-sized ciliates to direct suppression by small and large cladocerans [J]. Freshwater Biology, 1993, **29**: 19-29.
- [27] Lefèvre E, Bardot C, Noël C, *et al.* Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake [J]. Environmental Microbiology, 2007, **9**(1): 61-71.
- [28] Rankovic R. Five Serbian reservoirs contain different fungal propagules [J]. Mycologia, 2005, **97**(1): 50-56.
- [29] Luo J, Yin J F, Lei C, *et al.* Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China [J]. Fungal Diversity, 2004, **16**: 93-112.