

武汉东湖浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化

颜庆云^{1,2}, 余育和^{*1}, 张文静^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:对武汉东湖不同程度富营养化湖区, 即站 I、站 II 与站 III 浮游生物进行了群落级 DNA 多态性的 DNA 指纹研究, 并就其拓扑结构与富营养化特征参数之间关系进行了分析。实验结果如下: (1) 各站点总氮、总磷及叶绿素 a 分别为 1.146~2.235 mg/L、0.013~0.210 mg/L 和 40.25~109.22 μg/L; (2) 所筛选的 5 个随机引物共获得 29 个扩增位点, 其中多态位点占 75.9%, 各引物扩增谱带数在 2~6 间。站 III 的扩增条带数最多、谱带多态率最高 (69.6%)、特有带最多; (3) 特定浮游生物类群的特异性 PCR 扩增谱带为 1~6 条不等, 站间差别甚小。聚类及综合分析表明: DNA 指纹拓扑结构与浮游生物及特定浮游生物类群的物种多样性丰度相吻合, 并与富营养化主要指示参数存在明显相关, 即在一定范围内浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化程度呈反方向发展, 而原生动物则表现出同向性发展趋势。因此, 群落级 DNA 指纹分析不仅能为生态学研究洞开一片新颖的视窗, 并有可能孕育出一种简便而灵敏的水体富营养化危机预警系统。

关键词: DNA 多态性; DNA 指纹分析; 浮游生物群落; 富营养化; 武汉东湖

The DNA polymorphism of plankton community and eutrophication in Lake Donghu, Wuhan

YAN Qing-Yun^{1, 2}, YU Yu-He^{*1}, ZHANG Wen-Jing^{1, 2} (1. *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*; 2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3): 461~465.

Abstract: With increasing water pollution, much more attention has been paid to biodiversity and its relationship with environment in order to preserve biodiversity and manage water resources scientifically as well. Based on the previous investigation of the authors, which demonstrated that it is feasible to show genetic diversity by DNA fingerprinting, this study is further going to explore the relationship between DNA polymorphism of plankton community and eutrophication of target lake.

To assess the DNA polymorphism of plankton community, environmental samples were obtained from Donghu Lake areas with different trophic levels. After measuring the concentrations of TN, TP and Chl-a, the DNA polymorphism was assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR amplification with specific primers. Furthermore, correspondences between topology structure of DNA fingerprinting and three crucial factors (TN, TP, Chl-a) of eutrophication was analyzed. The experimental results were: (i) the concentrations of TN, TP and Chl-a at different sampling stations were 1.146~2.235 mg/L, 0.013~0.210 mg/L and 40.25~109.22 μg/L, respectively; (ii) five of twenty screened random primers used in the survey generated a total of 29 scorable RAPD bands, 75.9% of which were polymorphic and the number of bands scored per primer varied from two to six, additionally, the frequencies of polymorphisms at station III was the highest (69.6%), both the individual fragments and total number of bands at station III were the most; and (iii) the PCR amplification targeted as the

基金项目: 国家科技部 973 资助项目 (2002CB412308); 国家自然科学基金资助项目 (30390002); 中国科学院知识创新基金资助项目 (220207)

收稿日期: 2004-12-16; **修订日期:** 2005-02-01

作者简介: 颜庆云 (1979~), 男, 湖南衡阳人, 硕士生, 主要从事原生动物学研究。E-mail: yanqyun@ihb.ac.cn

*** 通讯作者** Author for correspondence. E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

Foundation item: Profile of 973 Program from the National Ministry of Science and Technology (No. 2002CB412308); the National Natural Science Foundation of China (No. 30390002); Knowledge Innovation Programs of Chinese Academy of Science (No. 220207)

Received date: 2004-12-16; **Accepted date:** 2005-02-01

Biography: YANG Qing-Yun, Master candidate, mainly engaged in protozoology. E-mail: yanqyun@ihb.ac.cn

peculiar group of plankton (protozoan community) showed that the number of bands scored per primer varied from one to six, and the marked discrepancy between stations was unobvious. Based on these experimental results, the clustering and synthetically analysis showed that the topology structure of DNA fingerprinting was correspondent to the species diversity of plankton community, so was the protozoan data and the eutrophication data. Concretely speaking, in a certain range, the DNA polymorphism of plankton community goes conversely to the level of eutrophication, while the protozoan community goes on the same direction.

In conclusion, results of the present investigation have indicated highly that DNA fingerprinting on plankton community would provide a new idea for ecological study, and it will be possible to conceive one simple and efficient forecasting system for the crisis of water resource.

Key words: DNA polymorphism; DNA fingerprinting; plankton community; eutrophication; Lake Donghu, Wuhan

文章编号:1000-0933(2005)03-0461-05 中图分类号:Q178.1 文献标识码:A

湖泊、河流、海洋等水体生态系统中的浮游生物是在物质转化和能量流动等方面起着极其重要作用且相互关联的生命系统。浮游生物之间及其与环境间均是密切相关的——浮游动物的生存不能脱离浮游植物,浮游植物的正常生活同样少不了浮游动物,这源于它们间经常性的能量转移和物质交换^[1];生物从环境中吸收新陈代谢所需要的营养物质,并把代谢产物排入环境,同时,生物通过自己的生命活动改变着周围环境。另一方面,生物为了生存也适应着不断变化的环境^[2,3]。总之,浮游生物与它们所生存的环境形成了一个结构和功能上的有机统一体。

DNA 多态性主要是指不同物种或同一物种内不同个体间基因组序列的差异,它是生物多样性的遗传基础^[4]。而 DNA 指纹分析正是广泛应用于种群及个体水平生命系统 DNA 多态性研究的一种强有力的分子生物学技术^[5],余育和等^[6]探讨了这一技术在群落级生命系统应用的可行性并获得了有益的结果。本文就是在这种基础上,将浮游生物视为一个功能类群进一步探索其 DNA 多态性与当今所普遍关注的湖泊富营养化指示参数,即总氮(TN)、总磷(TP)和叶绿素 a (Chl-a)的关系,以期为生态学研究提供一种思路、并为预警水资源及其所依赖的生态系统面临的威胁提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品的收集

采样点设在富营养化的武汉东湖,2003 年 9 月,在营养水平不同的水果湖区(I)、郭郑湖区(II)和汤林湖区(图 1)利用采水器在表层采取 1L 水作为制备浮游生物群落 DNA 水样,水样经充分混匀后,取 50 ml 沉淀 1h,去除杂质后离心(8000r/min, 5min)并转入一新的 1.5ml 离心管,用灭菌双蒸水清洗 3 次(每次清洗后 8000r/min 离心 3 min)以去除黏附于浮游生物表面的水溶性杂质。

1.2 群落 DNA 抽提

向浮游生物样品加入 600 μ l 裂解液(4%SDS; 250mmol/L Tris-Cl, pH=8.0; 60mmol/L Na₂EDTA)和蛋白酶 K(终浓度为 0.2mg/ml),室温下裂解 1h 后离心(6500r/min, 10min)并将上清转入一新的离心管。等体积酚抽提后用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)再抽提一次,上清液用 2/3 体积的冷异丙醇沉淀 3h、离心(13000r/min, 10min)、弃上清,然后用 70%冷乙醇清洗,干燥后溶于 TE 备用。总 DNA 用 0.7%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ l/ml 的 EB)进行电泳评估制备效果,并用 BECKMAN DU530 DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 含量及纯度。

1.3 RAPD 扩增

以 I 站浮游生物群落 DNA 为模板,并用灭菌双蒸水作阴性对照,从 Operon 公司 OPM-01~OPM-20 共 20 条随机引物中筛选出扩增结果稳定、谱带清晰、多态性好的 5 条引物(OPM-01、OPM-02、OPM-03、OPM-18、OPM-19)对 3 个站点的 DNA 模板

进行 RAPD 扩增。扩增反应参照 Williams 等^[7],在 25.0 μ l 反应体系中包含约 40ngDNA(模板量基本保持一致),2.5 μ l 10 $\times$ PCR buffer, 2 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 1.5 μ l 2mmol/L dNTP, 1.5ng 引物, 2 U Taq 酶(MBI 公司产品),其余用灭菌双蒸水补齐,混匀后稍离心将反应液集中于管底。在 Perkin Elmer™ 9600 型 PCR 仪上进行以下扩增:94℃预变性 5 min,后接 40 个循环(每个循

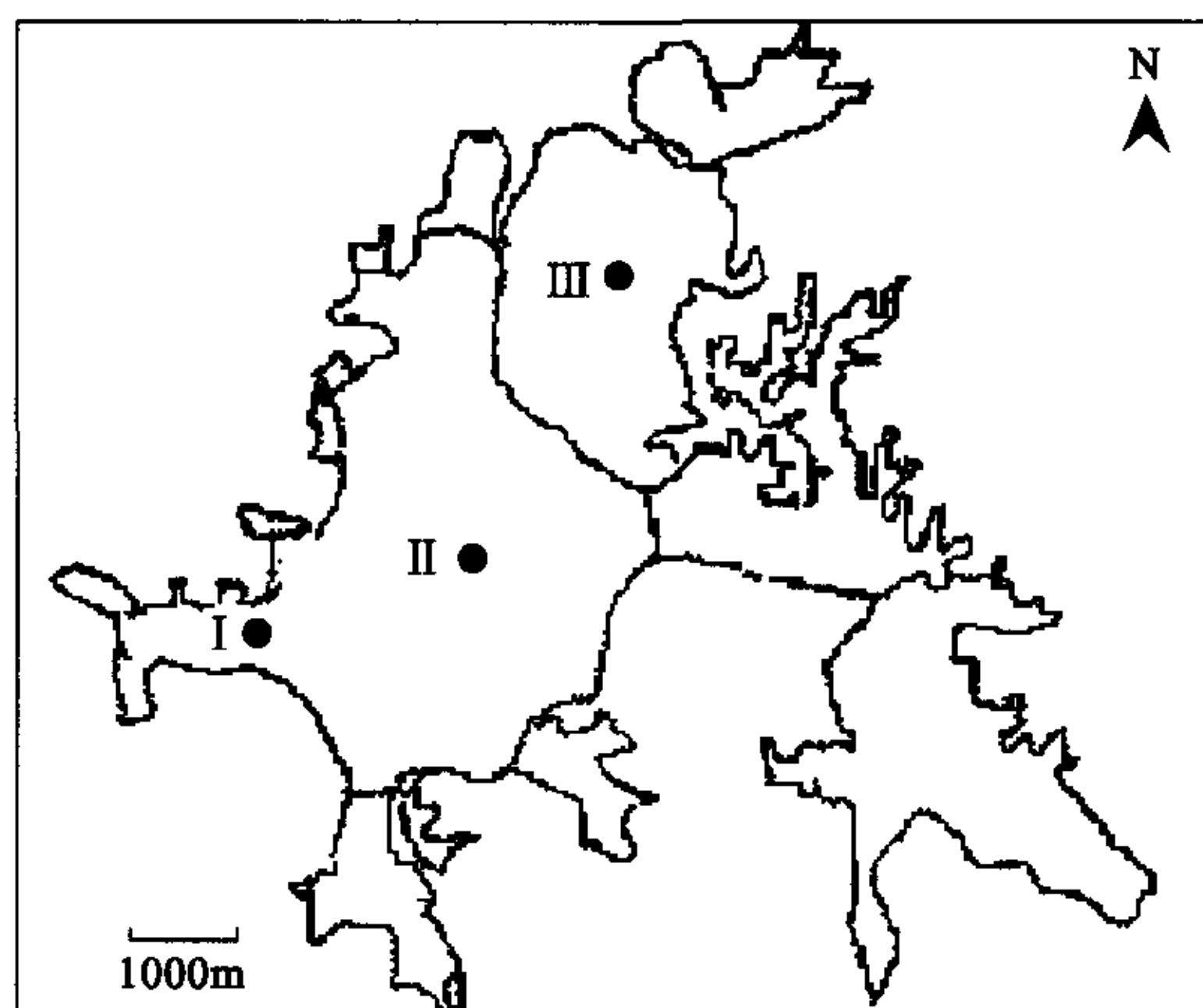


图 1 武汉东湖采样点分布图

Fig. 1 The distribution of sampling sites in Lake Donghu, Wuhan

环依次包含 94℃ 20s,36℃ 30s,72℃ 120s),然后 72℃ 延伸 5 min,反应终止于 4℃。用 1.4%的琼脂糖凝胶(含 0.5μg/ml EB)在 1×TAE 缓冲液中对扩增产物以 3V/cm (60V)的电压进行电泳分离、Image UVP 凝胶处理系统观察并一次性成像。

1.4 特异引物的 PCR 扩增

利用针对浮游生物特定类群——原生动物特定序列的特异引物(CW15946/47、EGMS6、EGMS4、ITS1 及 HSP)对 3 个站的浮游生物群落 DNA 进行 PCR 指纹分析。PCR 扩增程序如下:94℃ 预变性 5min,然后循环 35 次——94℃ 60s, X℃(因引物碱基不同而异)55s, 72℃ 55s;最后于 72℃ 延伸 10min,反应终止于 4℃。

1.5 数据统计及分析

为保证良好的重复性,每次 RAPD 扩增至少重复两次,稳定、清晰的谱带用于最终的数据分析。根据 200bp DNA Ladder 指示的标准分子量,对照反应产物在琼脂糖凝胶上的迁移率和 Image UVP 的扫描曲线,依据统一的标准确定片断大小,分别以 1、0 代表扩增位点的有、无输入计算机程序生成 0/1 矩阵并用 STATISTICA 6.0 软件(Ward's method)进行聚类。特异引物 PCR 扩增结果统计参照以上方法进行。

2 结果

2.1 总 DNA 抽提

本实验方法获得的 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.85~2.00 之间,经 0.7%的琼脂糖凝胶电泳后呈现单一区带,表明该方法提取的浮游生物群落总 DNA 在纯度上符合 PCR 的要求。

2.2 DNA 指纹分析

5 条随机引物共获得 29 个扩增位点,多态位点占 75.9%,各引物对不同站点 DNA 扩增得 2~6 条谱带,其中条带数最多的均出现在Ⅲ站,分别为 OPM-01 和 OPM-19 引物。I、Ⅱ、Ⅲ站分别获得 17、14、23 条谱带,其中Ⅲ站的有 69.6%是多态性带,I、Ⅱ站的多态率分别为 58.8%和 57.1%;此外,I、Ⅱ、Ⅲ站的特有带分别为 4、1、6 条(表 1)。RAPD 标记聚类(图 2,A)显示Ⅱ站和Ⅲ站优先聚在一起。

表 1 RAPD 标记及特异引物 RCP 扩增结果比对

Table 1 The pairwise comparison of RAPD markers and PCR amplification with specific primers		
采样站 Sampling station	条带的有无(分别用 1、0 表示) The presence and absence of fragments (record as 1, 0 respectively)	
	RAPD 标记 RAPD markers	特异引物 PCR 扩增 PCR with specific primers
I 站 Station I	01101110110001110011011100110	1110110110010100111010010101
Ⅱ站 Station Ⅱ	00110101100000110111110011000	0100010111100110001100111101
Ⅲ站 Station Ⅲ	11111101111110011011111111001	0101111011011101011001011011

特异引物尽管是针对原生动物的特定序列,但各引物在 3 个站均可获得 1~6 条数目不等的清晰条带。除引物 HSP 在 3 个站只获得一条大小相同的带外,其它在不同站间既有共有带,也有特异带(表 1),且差异甚小。从 STATISTICA 聚类(图 3.B)来看,I 站和Ⅱ站间的相似程度高于其它两两之间。

2.3 叶绿素 a 含量及主要理化特征

湖泊富营养化指示参数 TN、TP 及 Chl-a 的测定结果如表 2 所示,就此进行的相似性聚类分析显示 I、Ⅱ站间的相似程度高于 I、Ⅲ站或Ⅱ、Ⅲ站之间(图 2,C,D)。

表 2 东湖 I、Ⅱ、Ⅲ站 2003 年 9 月总氮、总磷及叶绿素 a 含量

Table 2 The concentration of TN, TP and Chl-a at station I, Ⅱ and Ⅲ in September 2003

采样站 Sampling station	总氮、总磷及叶绿素 a 含量 The concentrations of TN,TP and Chl-a		
	总氮 TN (mg/L)	总磷 TP (mg/L)	叶绿素 a Chl-a (μg/L)
I 站 Station I	2.235	0.210	102.52
Ⅱ站 Station Ⅱ	1.773	0.174	109.22
Ⅲ站 Station Ⅲ	1.146	0.013	40.25

* 东湖湖泊生态系统试验站提供的未发表数据 The unpublished data from Donghu Experimental Station of Lake Ecosy-stems

3 讨论

理论上讲,具有相似物种组成的生物群落应该拥有相似的 DNA 指纹图谱,因为各物种都有其特有的 DNA 遗传背景,而 DNA 指纹图谱恰是该背景重要表现。那么反过来是否可以通过 DNA 指纹图谱来反映群落结构呢?细菌等原核生物的研究^[8]支持了这一假设,余育和等^[6]的研究在真核生物层面也支持了这一点。此外,氮、磷等作为生物生长和发育的重要营养元素,是水生生物的关键制约因子,并且存在着某种意义上的对应关系(如环境指示种、优势种),关于富营养化与浮游生物、底栖动物多样性的研究^[9,10]就是很好的证明。鉴于此,本文将浮游生物视为一个功能类群进一步探索其 DNA 多态性与当今所普遍关注的湖泊富营养化问题间的关系。

3.1 东湖富营养化现状

武汉东湖是长江中下游的一个中小型浅水湖泊,20 世纪 70 年代以前水生高等植物密布、湖水多清澈见底,之后由于人类

活动的影响和环境的改变,湖泊极度富营养化,已由 20 世纪 60 年代的草型湖泊演变为现在的藻型湖泊。尽管自 1985 年蓝藻“水华”消失后比较一致的观点认为水果湖区(I 站)处于超富营养水平,东湖主体郭郑湖区(II 站)处于富营养水平,而汤林湖区(III 站)属中营养水平^[9,11]。但是,富营养化的特征参数,即 TN、TP 和 Chl-a 含量在同一机构的不同研究中表现出的年际差异较大,有时甚至是起伏变化(图 3),东湖富营养化状况果真如此?究其原因恐怕不完全是营养水平本身变化所致,还有可能是受测定方法、仪器设备、采样设计、操作人员等因素的影响。并分析浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化的关系。

3.2 浮游生物群落 DNA 多态性及其与富营养化的关系

RAPD 指纹分析表明 3 个站间的浮游生物群落遗传结构存在明显的表观差异——实验中获得的可分辨的谱带数 III 站最多,且多态率最高,特有带也是 3 个站中最多的,表明 III 站的浮游生物多样性是最高的。因为在同样的条件下,条带数的多少直接来源于模板与引物互补配对的几率大小,而配对几率又由模子(DNA 模板)所决定,供同一随机引物选择的模子多,理论上几率才大。这一推论与谢平等^[9]、雷安平等^[14]形态学分类研究认定处于中营养水平的汤林湖多数浮游生物类群的多样性是最高的结论是相符的。I 站和 II 站由于 TN、TP 及 Chl-a 含量高、污染导致富营养化严重,从而浮游生物种类相对较少。从 STATISTICA 的聚类来看,图 2A 和 C 的分支结构不一致,前者显示 II 站和 III 站相似性高,表明它们间的浮游生物群落 DNA 多态性较为相似;而后者显示 I 站和 II 站优先聚在一起,表明它们间的 TN、TP 及 Chl-a 背景值较为相近。事实上 I、II 站分别属于超富营养水平和富营养水平,营养水平都较高,相差不是太大,而处于中营养水平的 III 站则低得多;从生物多样性来看,III 站由于有大量的生活污水和工业废水的排入,水体超富营养化,

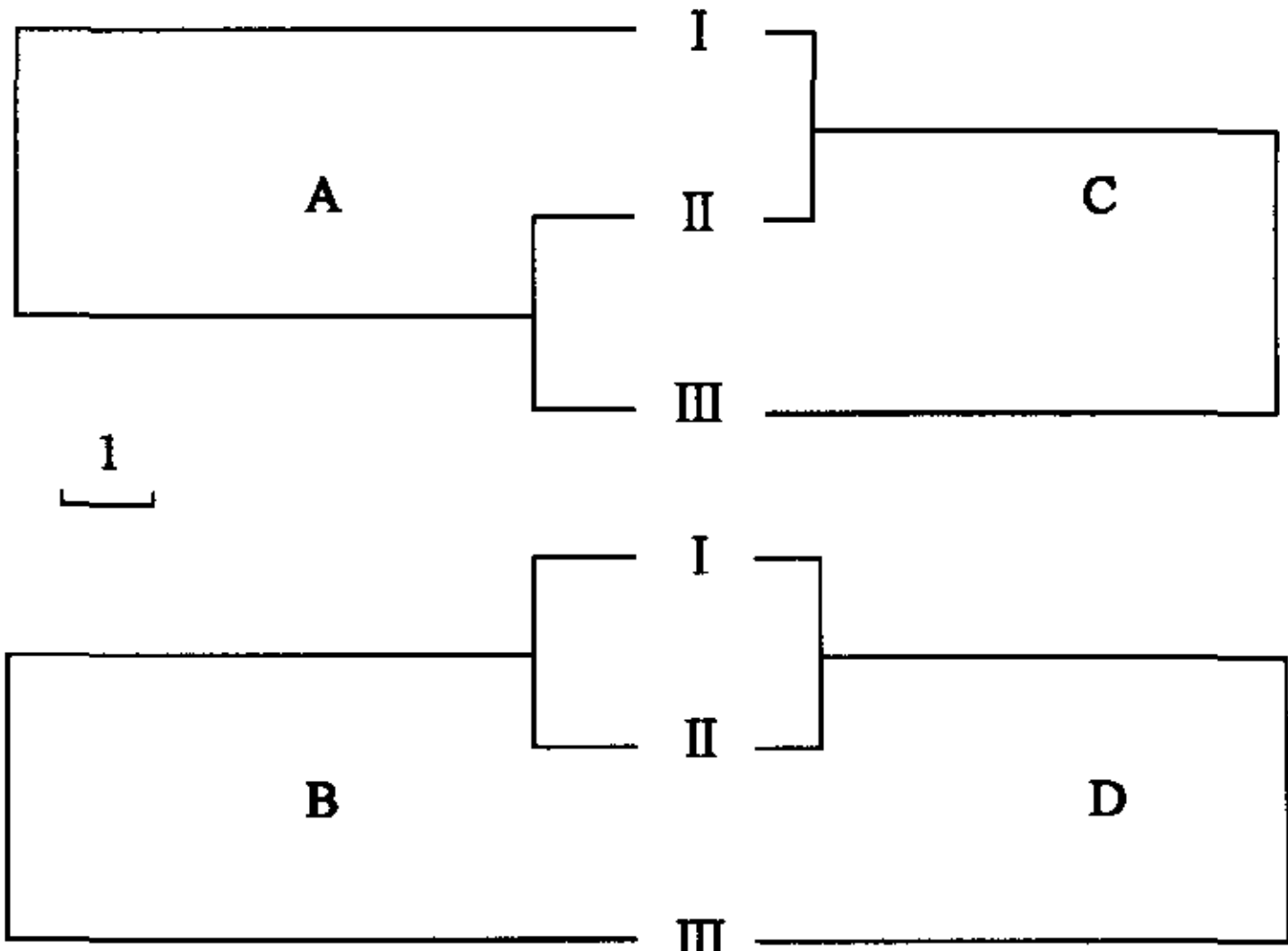


图 2 东湖 I、II、III 站相似性聚类

Fig. 2 The similarity clustering of station, I, II and III in Lake Donghu

A: 基于 RAPD 标记, B: 基于特异引物 RCP 扩增, C: 基于 2003 年 TN、TP 及 Chl-a 数据(表 2), D: 基于 2003 年 TN、TP 数据 A: Based on RAPD markers, B: based on PCR amplification with specific primers, C: based on the data of TN, TP and Chl-a in 2003 (Table 2), D: based on the data of TN, TP in 2003

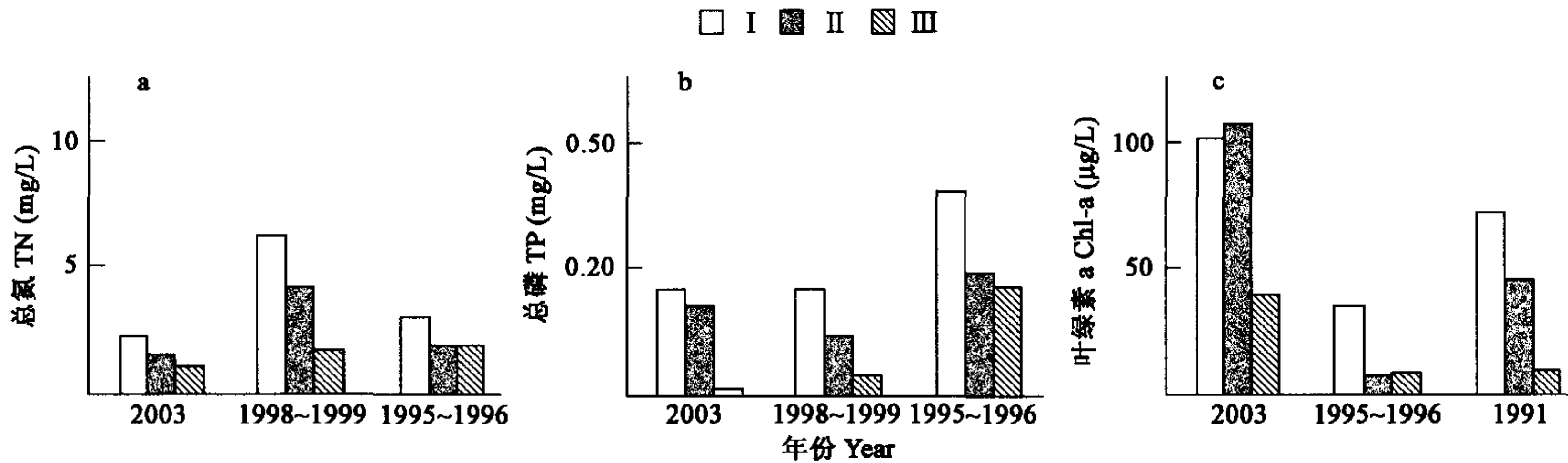


图 3 东湖 I、II、III 站总氮、总磷、叶绿素 a 含量年际变动

Fig. 3 The yearly variation of TN, TP and Chl-a at station, I, II and III in Lake Donghu

2003 年数据由东湖湖泊生态系统试验站提供;1998~1999 年数据引自龚志军等^[10];1995~1996 年数据引自杨宇峰等^[12];1991 年数据引自杨宇峰等^[13] The data of 2003 was provided by Donghu Experimental Station of Lake Ecosystems;the data of 1998~1999 was cited from Gong Z J *et al.* ^[10];the data of 1995~1996 was cited from Yang Y F *et al.* ^[12];the data of 1991 was cited from Yang Y F *et al.* ^[13]

以致只剩下一些耐污染的浮游生物种类,II 站和 III 站相对来讲则更适合浮游生物的生长,多样性相对较高^[9,14]。此外,由于原生动物是水资源质量评价的重要指示生物,利用针对原生动物特定序列的特异引物对群落 DNA 进行了试探性的扩增,结果显示各引物在不同站点得到 1~6 条长度在 200bp~1600bp 的谱带,且站间差异甚小。由于引物是针对原生动物的特定序列,所以理论上认为 PCR 指纹所反映的主要是原生动物 DNA 多态性。故此在进行聚类分析时我们省掉了与浮游植物密切相关的叶绿素 a 数据,仅用总氮、总磷数据与特异引物 PCR 指纹拓扑结构的聚类(图 2B,D)进行对比分析。两者的聚类结果完全一致,即 I、II 站优先聚在一起,然后再与 III 站并合。据此可以判定原生动物作为浮游生物的一特定类群,其多样性与富营养化程度具有同向性发展趋势,因为营养物质的增加促进了水质的肥沃,给原生动物提供了良好的饵料基础^[15,16]。

综上所述,尽管本文还只是对浮游生物群落 DNA 多态性及其与富营养化间关系的探索性研究,但这表明群落级 DNA 指

纹分析不仅能为生态学研究洞开一片新颖的视窗,并有可能孕育出一种简便而灵敏的水体富营养化危机预警系统。因此,将在完善现有技术和建立新的群落水平 DNA 指纹分析技术的同时逐步积累各类水体浮游生物群落遗传资料,并在综合分析群落 DNA 多态性与生物组成及理化因子关系的基础上探讨生态问题的分子机制,以期最终建立起完善的预警系统。

References:

- [1] Savin M C, Martin J L, LeGresley M, *et al.* Plankton Diversity in the Bay of Fundy as Measured by Morphological and Molecular Methods. *Microb. Ecol.*, 2004, **48** (1): 51~65.
- [2] Van Hannen E J, Van Agterveld M P, Gons H J, *et al.* Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Phycol.*, 1998, **34**(2): 206~213.
- [3] Wang J H, Huang X Q, Liu A C, *et al.* Tendency of the Biodiversity Variation Nearby Changjiang Estuary. *Marine Science Bulletin*, 2004, **23**(1): 32~39.
- [4] Mitchelson K R. The Use of Capillary Electrophoresis for DNA Polymorphism Analysis. *Mol. Biotechnol.*, 2003, **24**(1): 41~68.
- [5] Morton C O, Mauchline T H, Kerry B R, *et al.* PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol. Res.*, 2003, **107**(2): 198~205.
- [6] Yu Y H, Zhang W J and Yan Q Y. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system. *Acta Hytobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 457~463.
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**(22): 6531~6535.
- [8] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, **2**(3): 317~322.
- [9] Xie P, Zhu G Y, Dai M, *et al.* Effectes of the water eutrophic on plankton community diversity. *Acta Hytobiologica Sinica*, 1996, **20**: 30~37.
- [10] Gong Z J, Xie P, Tang H J, *et al.* The influence of eutrophication upon community structure and biodiversity of macrozoobenthos. *Acta Hytobiologica Sinica*, 2001, **25**(3): 210~216.
- [11] Shei P, Lin W, Wang S, *et al.* Plankton and seston structure in a shallow, eutrophic subtrophic Chinese Lake. *Arch. Hydrobiol.*, 1993, **129**(2): 199~220.
- [12] Yang Y F and Huang X F. Community Analysis of Crustacean Zooplankton in Main Culture Areas of Lake Donghu, Wuhan. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(3): 318~325.
- [13] Yang Y F and Huang X F. Structure of zooplankton community in Donghu Lake of Wuhan. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, **5**(3): 319~324.
- [14] Lei A P, Shi Z X and Wei Y X. Diversity of the phytoplankton in Donghu lake, Wuhan. *Acta Hytobiologica Sinica*, 2003, **27**(2): 179~184.
- [15] Gong X J. The development of eutrophication in Lake Donghu, Wuhan, during the last two decades based on the investigation of protozoan changes. *Acta Hytobiologica Sinica*, 1986, **10**(4): 340~352.
- [16] Wu S G and Shen Y F. On the protozoan succession from the viewpoint of temporal and spatial heterogeneity in eutrophic Donghu Lake. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(3): 448~451.

参考文献:

- [3] 王金辉,黄秀清,刘阿成,等. 长江口及邻近水域的生物多样性变化趋势分析. 海洋通报, 2004, **23**(1): 32~39.
- [6] 余育和,张文静,颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性. 水生生物学报, 2004, **28**(5): 457~463.
- [9] 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. 水生生物学报, 1996, **20**(增刊): 30~37.
- [10] 龚志军,谢平,唐汇涓,等. 水体富营养化对大型底栖动物群落结构及其多样性的影响. 水生生物学报, 2001, **25**(3): 210~216.
- [12] 杨宇峰,黄祥飞. 武汉东湖主要养殖水域的浮游甲壳动物群落分析. 生态学报, 2002, **22**(3): 318~325.
- [13] 杨宇峰,黄祥飞. 武汉东湖浮游动物群落结构的研究. 应用生态学报, 1994, **5**(3): 319~324.
- [14] 雷安平,施之新,魏印心. 武汉东湖浮游藻类物种多样性的研究. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 179~184.
- [15] 龚循矩. 从原生动物变化看武汉东湖富营养化的发展. 水生生物学报, 1986, **10**(4): 340~352.
- [16] 吴生桂,沈韞芬. 从时空异质性看东湖富营养化中原生动物的演替. 生态学报, 2001, **21**(3): 448~451.