

洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构 与物种组成对应关系

颜庆云^{1,2}, 余育和^{1*}, 冯伟松¹

(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:对东洞庭湖 7 个采样站点的浮游生物群落进行了 DNA 多态性的 RAPD 指纹分析和物种组成的分类鉴定, 并通过聚类分析探讨了 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系。结果如下: (1) 筛选出的 11 条随机引物共获得 148 条长度在 180~2000bp 的谱带, 多态率为 98.6%, 各引物扩增谱带数在 11~16 不等; 各站点平均有 57.6 条谱带, 其中 VI 站最多 (70 条), IV 站最少 (45 条), 而 I 站的特有带最多 (7 条), II 站最少 (2 条); (2) 共观察到 54 种/类浮游生物, 其中 IV 站出现的最多 (27), 其它各站点在 7~13 不等, 分布概率在 85% 以上的只有直链硅藻 (*Melosira* sp.)。相似性聚类分析表明: 7 个站点的浮游生物群落可以划分为两大类——IV 站作为单独的一类而明显有别于其它 6 站; 并且, RAPD 分析在此基础上将 I、II、V 站和 I、VI、VII 站进一步分作两小类。因此, 研究说明浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成是密切相关的, 这类资料的积累将会为生态系统功能、机理的解释或阐明提供一些启示。

关键词:浮游生物群落; RAPD; DNA 指纹拓扑结构; 生物多样性; 洞庭湖

文章编号:1000-0933(2005)09-2221-06 **中图分类号:**Q17, Q178.1 **文献标识码:**A

Corresponding relations between DNA fingerprinting topological structure and species composition of plankton community in Dongting Lake

YAN Qing-Yun^{1,2}, YU Yu-He^{1*}, FENG Wei-Song¹ (1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(9): 2221~2226.

Abstract: As the confluence of natural resources, biodiversity has become the focus of ecological study. Plankton, as an important part of the biodiversity and cosmopolitan organisms, plays a key role in nutrient cycling and energy flows. Because of its high sensitivity to environmental changes and its short life span, plankton is also used as indicators of environmental variables and aquatic ecosystem health. However, most of the studies have focused on investigating the community composition. To completely reveal the molecular mechanism of some ecological functions, the authors extended the DNA fingerprinting techniques to plankton community and obtained some valuable information.

The present study was designed to further explore the genetic diversity of plankton communities in Dongting Lake and to examine the relationships between DNA polymorphism and species composition. Environmental samples were obtained from seven sampling sites in Eastern Dongting Lake. Following the species identification, the DNA polymorphism was assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD), their relations were then assessed with cluster analysis. The results were: (i) 11 of 80 screened random primers used in the study amplified a total of 148 observable bands, 98.6% of which were polymorphic and the number of bands scored per primer varied from 11 to 16; the mean number of amplified bands at different stations was 57.6, samples from station VI had the maximum number (70) and the station IV the minimum (45); the number

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30390002); 国家科技部 973 资助项目(2002CB412308)

收稿日期:2005-04-21; **修订日期:**2005-07-26

作者简介:颜庆云(1979~), 男, 湖南衡阳人, 硕士生, 主要从事浮游生物生态学研究。E-mail: yanqyun@ihb.ac.cn

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

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (No. 30390002); 973 Program from the Ministry of Science and Technology of China (No. 2002CB412308)

Received date: 2005-04-21; **Accepted date:** 2005-07-26

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

of individual bands at station I was the most and the station II was the least; (ii) a total of 54 planktonic taxa were identified, most of them to species level or higher; the detected taxa at the station IV were the most (27) and ranged between 7 and 13 at other stations, some species were detected at several stations, but much more taxa were restricted to single stations. Cluster analysis based on RAPD markers and species composition showed that the target communities could be grouped into two clusters. The station IV comprised a single cluster, and another cluster contained the other six stations. Additionally, the clustering of RAPD makers could set further divide the stations II, III, V and I, VI, VII to two subgroups.

In conclusion, our results suggested that the DNA polymorphism of plankton community was closely related to the species composition, and the genetic data accumulated will provide inspiration for elucidating the ecological function and mechanism.

Key words: plankton community; RAPD; DNA fingerprinting topological structure; biodiversity; Dongting Lake

生物多样性是指生命有机体及其赖以生存的生态复合体的多样性和变异性,包括遗传多样性、物种多样性与生态系统多样性等层次。生物多样性在维持生态系统稳定、实现其可持续发展等方面均起着重要作用,因此,自人类文明以来它就被广泛关注与研究。物种多样性是最早涉及并研究的,现已定名或描述的物种达 140 万^[1],多样性指数达数十个^[2,3];随着物种资料的积累和对大尺度环境功能知识的需求增加,生态系统多样性也进入生态学家的视野;遗传多样性研究随着分子生物学的迅速发展也有了实质意义上的认识,但广义的遗传多样性方面还很薄弱。生物多样性的各层次间是相互依赖的有机体,对高层次结构功能的阐释要以低层次结构的全面认识为基础。因此,对物种及遗传多样性的充分认识是揭示生态系统结构与功能的前提。

浮游生物作为世界性分布的生物类群在水平方向呈片状分布,并具垂直分布现象^[4],其数量大、种类组成复杂,是生物多样性的的重要组成部分。并且,在水体生态系统的物质转化、能量流动、信息传递等过程中起着至关重要的作用,已成为水体生态系统结构和功能研究重点对象^[5-7]。本研究在已有的关于浮游生物群落遗传多样性研究工作基础上^[8,9]用 RAPD 技术揭示浮游生物群落 DNA 多态性、探索其群落结构并分析它们与物种组成的相关关系,以期通过 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系来阐明浮游生物群落遗传多样性与物种多样性的内在联系、揭示某些生态问题的分子机制。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

采样设在长江中下游大型湖泊——洞庭湖,2004 年 11 月在东洞庭湖及其与长江的汇水口设置 I~VII 共 7 个站点采样(图 1),自表层至底层以 0.5m 的间隔分别在各层用采水器采取 1L 水经 25 号浮游生物网(孔径 64 μ m)过滤后收集于 50ml 塑料瓶,现场用福尔马林液固定(甲醛 1%)。

1.2 种类鉴定

浮游生物种类的鉴定在 Zeiss Axioplan 2 imaging 显微镜下进行(200 $\times$),各样品观察 3 块玻片。大多数鉴定到种或属,极个别鉴定到站间可以区分即可,并将其转化为 0/1 矩阵用 SPSS 12.0 软件进行浮游生物群落结构的相似性聚类。

1.3 群落 DNA 抽提

水样经充分混匀后各取 5ml 于 8000r/min 离心 5min,用灭菌双蒸水清洗 3 次(每次清洗后 8000r/min 离心 3min)以去除甲醛味及黏附于浮游生物表面的水溶性杂质。DNA 的抽提参照 Coombs 等^[10]的 Chelex-100 法并加以适当的改进:向浮游生物样品加入 100 μ l 0.5% Tween-20,在热循环仪上加热至 90 $^{\circ}$ C 并保持 10min;恢复至室温后加入 1 μ l 20 mg/ml 的蛋白酶 K 在 55 $^{\circ}$ C 的水浴中温浴 3h;加入 100 μ l 抽提纯化缓冲液(0.25% Tween-20, 0.025% SDS, 10mmol/L Tris-Cl, 0.5mmol/L EDTA, pH 8.0)后在热循环仪上加热至 99 $^{\circ}$ C 并保持 10min;恢复至室温后经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿两次抽提后保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.4 RAPD 扩增

RAPD 扩增在 Perkin Elmer™ 9600 型 PCR 仪上进行,首先以 I 站浮游生物群落 DNA 为模板经对 DNA 模板量、引物浓度、Mg²⁺ 浓度及 PCR 循环参数优化后从 Operon 公司的 OPG、OPH、OPM 及 OPV 4 组共 80 条随机引物中筛选出扩增结果稳

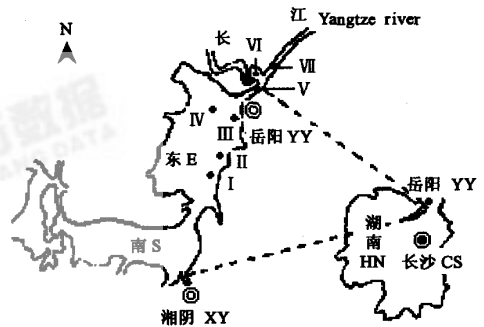


图 1 洞庭湖采样点位置图

Fig. 1 Location of sampling sites in Dongting Lake

东 E 东洞庭湖 Eastern Dongting Lake; 南 S 南洞庭湖 Southern Dongting Lake; HN 湖南省 Hunan province; CS 长沙 Changsha; YY 岳阳 Yueyang; XY 湘阴 Xiangyin

定、谱带清晰、多态性好的 11 条引物(表 1)对 7 个站点的 DNA 模板进行 RAPD 扩增。扩增体系参照 Williams 等^[11],在 25.0 μ l 体系中包含约 50ng DNA(各模板量基本保持一致),2.5 μ l 10 $\times$ PCR buffer,2.0 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 1.0 μ l 2mmol/L dNTP, 1.5ng 引物,1.25U 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进行以下扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,后接 45 个循环(每个循环依次包含 94 $^{\circ}$ C 40s,38 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 120s),然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,反应终止于 4 $^{\circ}$ C。用 1.8% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/ml EB)在 1 $\times$ TAE 缓冲液中对扩增产物以 4V/cm(80V)的电压进行电泳分离、UVP 凝胶成像分析系统处理系统观察并一次性成像。

表 1 随机引物及其 RAPD 扩增结果
Table 1 Random primers and the amplified results

引物 Primers	碱基序列 (5'-3') Nucleotide sequence	扩增片断大小 (bp) Sizes of fragments	谱带数 Number of fragments	谱带多态率 The polymorphic rate
OPV-20	CAGCATGGTC	200~2000	16	100%
OPV-19	GGGTGTGCAG	200~1000	12	91.7%
OPV-15	CAGTGCCGGT	180~1000	14	100%
OPV-07	GAAGCCAGCC	350~1200	12	100%
OPM-12	GGGACGTTGG	300~1600	14	100%
OPM-01	GTTGGTGGCT	200~1600	13	100%
OPH-20	GGGAGACATC	200~1200	15	100%
OPH-12	ACGCGCATGT	220~1200	13	92.3%
OPH-06	ACGCATCGCA	280~1150	11	100%
OPG-07	GAACCTGCGG	250~1400	14	100%
OPG-06	GTGCCTAACC	250~1400	14	100%
总计 Total	—	180~2000	148	98.6%

1.5 数据统计及分析

各 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(华美生物工程公司提供)指示的标准分子量,对照扩增产物在琼脂糖凝胶上的迁移率和 UVP Lab Works 软件的光密度扫描曲线,依据统一的标准确定各扩增片断的大小,分别以 1.0 代表扩增位点的有、无输入 RAPDistance 1.04 程序并进行 Neighbour-Joining 聚类。关于浮游生物种类组成的聚类通过 SPSS 12.0 软件的 Ward's method 完成。

2 结果

2.1 物种组成

7 个采样点共观察到 54 种/类浮游生物,其中Ⅳ站出现的种/类数最多(27),其它 6 个站点在 7~13 不等。在 7 个站点的分布概率高于 85% 的只有直链硅藻(*Melosira* sp.),分布概率在 50%~85% 的有颗粒直链硅藻(*Melosira granulata*)、平板藻(*Tabellaria* sp.)、双菱藻 1(*Surirella* sp.1)及盘星藻(*Pediastrum* sp.),其它的低于 50%。在所观察到的浮游生物中,直链硅藻、颗粒直链硅藻、平板藻、盘星藻、微囊藻(*Microcystis* sp.)及马氏虫(*Mayorella* sp.)在某一站或多站出现的频率较高(“+”号数在 5 以上,表 2)。

2.2 总 DNA 抽提

本实验所用方法获得的 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值在 1.69~1.74,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。

2.3 RAPD 指纹分析

电泳图谱较为清晰(如图 2),11 条随机引物共获得 148 条长度在 180~2000bp 的谱带,其中 98.6% 的条带为多态性带,26.4% 的谱带为特有带(仅出现在 1 个站点),唯有标记为 OPV19-600 及 OPH12-450 的两条带在 7 各采样站均被检测到,OPV19-450 及 OPV15-550 在 6 个站出现。各站的平均谱带数为 57.6,其中Ⅵ站最多(70 条),Ⅳ站最少(45 条);Ⅰ站的特有带最多(7 条),而Ⅱ站最少(2 条)。

2.4 聚类分析

基于 RAPD 指纹分析的 Neighbour-Joining 聚类图(图 3 A)显示Ⅳ站与其它各站的相似性最低,成为单独的一枝,这与物种组成的 Ward's method(SPSS 12.0)聚类结果(图 3 B)是一致的。物种组成的相似性聚类(图 3 B)表明其它 6 个站没有明显的差异,经逐步聚合后在距离为 8.5 附近聚成一大类,而 RAPD 聚类(图 3 A)显示Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ站和Ⅰ、Ⅵ、Ⅶ站分别聚成一小类后再聚合为一大类。从相似系数矩阵(表 3)来看,各站间相似系数(Jaccard's)在 0.1720~0.3956,其中Ⅲ站与Ⅳ站间的相似性最低,Ⅲ站与Ⅴ站间最高。Ⅳ站与其它各站的相似性均较低,除了它与Ⅱ站间稍高外(0.2639),其它都较平均值(0.2627)低得多,这也反映了Ⅳ站的浮游生物群落与其它站点相比存在明显的差异。

表 2 浮游生物群落物种组成
Table 2 The species composition of plankton community

种名 Species	采样站 Sampling sites						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
直链硅藻 <i>Melosira</i> sp.	+++	++++	+++++		+++++	+	++++
颗粒直链硅藻 <i>Melosira granulata</i>	+		+++	+++++	+	+++++	
平板藻 <i>Tabellaria</i> sp.	+		+	+	+++++	+++	
膨胀桥弯藻 <i>Cymbella tumida</i>					+		
异极藻 <i>Gomphonema</i> sp.	+				+	+	
脆杆藻 <i>Fragilaria</i> sp.	+				+		
短线脆杆藻 <i>Fragilaria brevistriata</i>				++			
钝脆杆藻 <i>Fragilaria capucina</i>			++			+	
尖针杆藻 <i>Synedra acus</i>				++++		+	
尖布纹藻 <i>Gyrosigma acuminatum</i>							+
细布纹藻 <i>Gyrosigma kuetzingii</i>			+				
舟形藻 <i>Navicula</i> sp.						+	+
系带舟形藻 <i>Navicula cincta</i>							+
披针曲壳藻 <i>Achnanthes lanceolata</i>						+	
双菱藻 <i>Surirella</i> sp. 1	+		+	+		+	+
双菱藻 <i>Surirella</i> sp. 2				+			
硅藻 <i>Bacillariophyta</i> 1				+			
硅藻 <i>Bacillariophyta</i> 2							+
硅藻 <i>Bacillariophyta</i> 3							+
硅藻 <i>Bacillariophyta</i> 4						+	
硅藻 <i>Bacillariophyta</i> 5				+			
二形栅藻 <i>Scenedesmus dimorphus</i>				+			
盘星藻 <i>Pediastrum</i> sp.	+	+		+++++	++++	+	
空球藻 <i>Eudorina</i> sp.					+		
胶毛藻 <i>Chaetophora</i> sp.					+++		
角鼓藻 <i>Cosmarium angulosum</i>				+			
微囊藻 <i>Microcystis</i> sp.				+++++	++++		
溪生须藻 <i>Homoeothrix fluviatills</i> Jao				+		+	++
巨颤藻 <i>Oscillatoria princeps</i>		+					
裸藻 <i>Euglena</i> sp.				+			
梭型裸藻 <i>Euglena acus</i>		+					
强壮短缝藻 <i>Eunotogramma debile</i> Grunow				+			
藻类 <i>Algae</i> 1				+			+
江苏似铃壳虫 <i>Tintinopsis kiangsuensis</i>					+		+
针棘匣壳虫 <i>Centropyxix aculeata aculeata</i>						+	
马氏虫 <i>Mayorella</i> sp.		++++	+++++				
鳞壳虫 <i>Euglypha</i> sp.			+				
钟虫 <i>Vorticella</i> sp.				+			
砂壳虫 <i>Diffugia</i>			+				
变形虫 <i>Amoeba</i>	+						
针棘多肢轮虫 <i>Polyarthra trigle</i>				+			
臂尾轮虫 <i>Brachionus</i>				+			
角突臂尾轮虫 <i>Brachionus angularis</i>				+			
晶囊轮虫 <i>Asplanchna</i>				+			
浮削尖叶轮虫 <i>Notholca acuminata</i> var. <i>limnetica</i> +							
矩形龟甲轮虫 <i>Keratella quadrata</i>		+		+			
螺型龟甲轮虫 <i>Keratella cochlearis</i> var. <i>hispida</i>				+++	++		
龟甲轮虫 <i>Keratella</i> sp. 1				+			
龟甲轮虫 <i>Keratella</i> sp. 2				+			
龟甲轮虫 <i>Keratella</i> sp. 3							+
龟甲轮虫 <i>Keratella</i> sp. 4				+			
轮虫 <i>Rotaria</i> sp.				+			
象鼻溞 <i>Bosmina</i> sp.					+		
大型无脊椎动物 <i>Large invertebrate</i>		+					

+ 表示出现的频率 Presents the frequency of occurrences

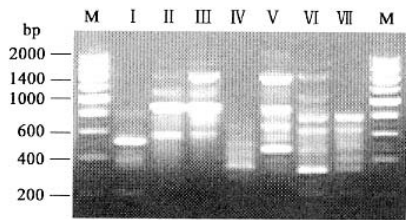


图 2 OPV-20 引物 RAPD 电泳图谱

Fig. 2 RAPD profile generated using random primer OPV-20
M 200bp DNA Ladder; I ~ VII Sampling sites from I to VII

表 3 RAPD 相似系数矩阵(上三角)及距离矩阵(下三角)

Table 3 The similarity matrix (above diagonal) and distance matrix (below diagonal) of RAPD

	I	II	III	IV	V	VI	VII
I		0.2069	0.2551	0.2235	0.2708	0.2647	0.3068
II	0.7931		0.3580	0.2639	0.3133	0.2473	0.2143
III	0.7449	0.6420		0.1720	0.3956	0.2642	0.3483
IV	0.7765	0.7361	0.8280		0.2000	0.1856	0.2317
V	0.7292	0.6867	0.6044	0.8000		0.2547	0.2526
VI	0.7353	0.7527	0.7358	0.8144	0.7453		0.2857
VII	0.6932	0.7857	0.6517	0.7683	0.7474	0.7143	

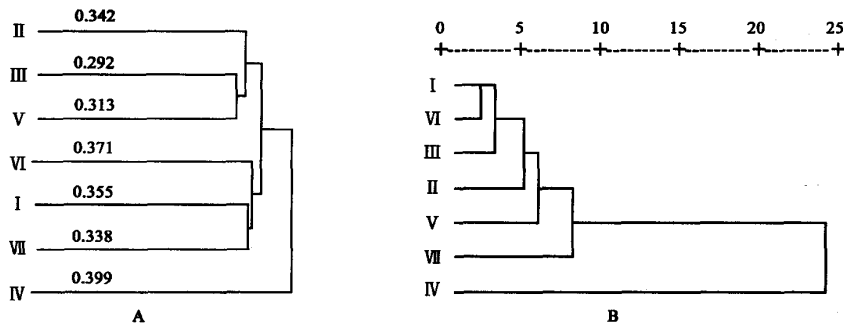


图 3 洞庭湖各采样点浮游生物群落相似性聚类

Fig. 3 The similarity clustering of the plankton community from different sites in Dongting Lake
A: 基于 RAPD 标记 Based on RAPD markers; B: 基于物种组成 Based on species composition

3 讨论

随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)由于操作简便、可供选择的引物多、且不需预知模板 DNA 序列信息,已被广泛应用于遗传多样性的研究。当然,RAPD 也存在其自身的不足,主要表现为重复性不够好,但这可以通过条件的优化来适当地加以控制^[12]。为保证重复性,本研究就 DNA 模板量、引物浓度、Mg²⁺ 浓度及 PCR 循环参数等条件进行了优化组合,在筛选出稳定性好、多态性高、谱带清晰的引物后获得了较为理想的指纹图谱(如图 2)。本文在余育和等^[9]提出浮游生物 DNA 指纹图谱拓扑结构与物种多样性存在着关联的基础上进一步探讨 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系,以期建立浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成关系模型打下基础、在积累湖泊浮游生物群落遗传多样性基础资料的同时为某些生态问题分子机制的阐释提供依据。

3.1 浮游生物群落 DNA 多态性

理论上讲,由于各物种的 DNA 遗传背景不同,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;反过来也可以通过 DNA 指纹图谱来反映群落结构^[8]。RAPD 指纹分析共获得的 148 条谱带中 98.6% 为多态性带,26.4% 的为特有带,而只有 2 条为共有带。从聚类分析来看,基于 RAPD 标记的聚类可以将物种组成聚类认为是一类的 II、III、V 站与 I、VI、VII 站进一步分开(图 3)。由此可以看出浮游生物群落 DNA 多态性提供的信息量似乎要比物种组成多,这可能与形态分类方法本身的局限及 DNA 指纹分析在 DNA 水平更为直接、客观地揭示生物多样性是分不开的。结合在微生物群落、尤其是细菌等原核微生物群落的分子研究已揭示了越来越丰富的多样性来看^[13,14],DNA 指纹分析在浮游生物群落遗传多样性的研究中具有很大的潜能。

3.2 浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成对应关系

洞庭湖作为中国的第二大淡水湖,由于入湖水系复杂、湖水泥沙含量高、透明度低、水位变幅大等原因,浮游生物数量及生物量较长江中下游其它大中型湖泊(如太湖、洪泽湖)低^[15]。本研究的分类结果在一定程度上也支持这一点:7 个采样站点除了 IV 站出现 27 种/类外,其它只观察到 7~13 种/类不等,而仅在一个采样点出现的占总数的 68.5%(表 2)。理论上讲,如果两站点拥有相似的浮游生物群落,其 DNA 指纹拓扑结构应趋于相似;事实上,本研究中基于 RAPD 标记和物种组成的聚类大体上

是吻合的:Ⅳ站都被聚为单独的一类;Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ站与Ⅰ、Ⅵ、Ⅶ站虽然在 RAPD 标记聚类中被分作两小类,但它们在距离稍远的位置马上就合并了(图 3 A),这与物种组成的分枝关系(图 3 B)是一致的,即Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ号站点聚成一大类而有别于Ⅳ站。Ⅳ站之所以完全有别于其它各站,主要是由于其特殊的地理位置导致了浮游生物的生存环境有别于其它站点——Ⅳ站位于君山西南部,各类污水排放相对较少;再者,濒临的长江也承担了相当一部分的污水排放;Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ站沿着东洞庭湖的东岸线自南往北分布,受岳阳及其临近地区工业的影响接纳沿岸的工业废水和生活污水较多;Ⅴ站位于湖水北流入长江的城陵矶,Ⅵ、Ⅶ站为江、湖水混合前后的样点(图 1),水具有一定的流速而有别于湖泊的静水。因此,相比较而言Ⅳ站更有利于浮游生物的生存,以致在该站观察到的种类数占总数的 50%,且只在此站点出现的就有 17 种,其它各站点的差异不明显。浮游生物群落 DNA 多态性也检测到了Ⅳ站的特别,此外,RAPD 标记还将剩余的 6 个站点进一步划分为两类,其中一类是从鹿角往北经岳阳到城陵矶连续的 3 个站——Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ站;另一类包括了位于中洲的Ⅰ站和江、湖水混合前后的两个站点——Ⅵ、Ⅶ站(图 3 A)。

综上所述,利用 DNA 指纹技术分析各类水体生态系统中浮游生物群落遗传结构、进而研判所获得 DNA 多态性与物种多样性的对应关系,这种基础资料的积累将会为生态系统功能、机理的解释或阐明提供重要的启示。

References:

- [1] Willson E O. *Biodiversity*. Washington D C: National Academy of Science Press, 1988.
- [2] Menhinck E F. A comparison of some species-individuals diversity indices applied to samples of field insects. *Ecology*, 1964, **45**(4): 859~861.
- [3] Lamont B B, Downes S and Fox J E D. The Q-statistic and the diversity of floras. *Nature*, 1978, **257**: 252~253.
- [4] Shen Y F, Zhang Z S, Gong X J, et al. *Modern biomonitoring techniques using freshwater microbiota*. Beijing: China Architecture and Building Press, 1990.
- [5] Guo P Y, Shen H T, Liu A C, et al. The species composition, community structure and diversity of zooplankton in Changjiang estuary. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(5): 892~900.
- [6] Lin Q Q, Hu R, Duan S S, et al. Reservoir trophic states and the response of plankton in Guangdong Province. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(6): 1101~1108.
- [7] Xu M Q, Cao H, Jia Q X, et al. Preliminary study of plankton community diversity of the Gahai Salt Lake in the Qaidam Basin of the Qinghai-Tibet Plateau. *Biodiversity Science*, 2002, **10**(1): 38~43.
- [8] Yan Q Y, Yu Y H and Zhang W J. The DNA polymorphism of plankton community and eutrophication in Lake Donghu, Wuhan. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, **25**(3): 461~465.
- [9] Yu Y H, Zhang W J and Yan Q Y. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 457~463.
- [10] Coombs N J, Gough A C and Primrose J N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27**(16): e12~17.
- [11] 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.
- [12] Pharmawati M, Yan G and McFarlane I J. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). *Australian Systematic Botany*, 2004, **17**(1): 49~61.
- [13] Moon-van der Staay S Y, De Wachter R and Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 2001, **409**: 607~610.
- [14] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734~740.
- [15] Du H S and Jiang J H. *Dongting Lake*. Hefei: University of Science and Technology in China Press, 2000.

参考文献:

- [4] 沈蕴芳, 章宗涉, 龚循矩, 等. 微型生物监测新技术. 北京: 中国建筑工业出版社, 1990.
- [5] 郭沛涌, 沈煊庭, 刘阿成, 等. 长江河口浮游动物的种类组成、群落结构及多样性. 生态学报, 2003, **23**(5): 892~900.
- [6] 林秋奇, 胡初, 段舜山, 等. 广东省大中型供水水库营养现状及浮游生物响应. 生态学报, 2003, **23**(6): 1101~1108.
- [7] 许木启, 曹宏, 贾沁贤, 等. 青藏高原柴达木盆地尕斯库勒湖浮游生物群落多样性特征的初步研究. 生物多样性, 2002, **10**(1): 38~43.
- [8] 颜庆云, 余育和, 张文静. 武汉东湖浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化. 生态学报, 2005, **25**(3): 461~465.
- [9] 余育和, 张文静, 颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级生态系统应用的可能性. 水生生物学报, 2004, **28**(5): 457~463.
- [15] 窦鸿身, 姜加虎. 洞庭湖. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2000.