

洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系

颜庆云^{1,2} 余育和¹ 冯伟松¹ 梁小民¹ 谢 平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 DNA 多态性进行了 RAPD 指纹分析,并探讨了其 DNA 指纹与理化因子的关系。结果如下:(1)从 80 条随机引物中筛选出的 11 条引物共获得 148 条谱带,多态率为 98.6%;所用引物在各站点可获得 45—70 条扩增谱带,平均为 57.6 条,其中 站最少;(2) 站的泥沙含量最高(75.5mg/L),其他各站在 1.2—40.3mg/L;各站点间的 pH 值比较接近,都呈弱碱性; 站的 TN、TDN 及 TP 含量最高, 站的 TDP 最高,但各站点相差不大。相似性聚类分析表明,浮游生物群落 DNA 指纹将 7 个站点划分为两大类—— 站作为单独的一类而明显有别于其他 6 个站点,这与洞庭湖浮游生物分布的主要制约因子——泥沙含量的聚类结果是一致的。因此,研究表明浮游生物群落 DNA 指纹与环境主要限制因子是密切相关的,这类资料的积累将为建立简易、有效的水资源质量评价体系提供科学依据。

关键词:浮游生物;RAPD;DNA 指纹;理化因子;洞庭湖

中图分类号:Q178.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2005)06-0601-06

水是生命之源,又是一切生物赖以生存的物质基础;古代文明无一不是在大江大河流域孕育和诞生,所以水体也是人类文明的摇篮。可以说没有水就不会有生命的发生,没有水域就不会有生命的发展,更不会有人类的繁荣^[1,2]。然而,水体所得到回报却是人类的干扰和破坏,尤其是工业革命以来,水资源及其所依赖的生态系统面临着愈来愈严峻的威胁^[3,4]。因此,如何维持水体生态系统健康以实现自然资源的平等共享和可持续发展就成为了举世关注的热点问题^[5]。水资源的科学评价是实现上述目标的前提,于是发展了各种各样的评价方法,其中生物评价倍受关注^[6]。自 1908 年 Kolkwitz 和 Marrson^[7]提出河流有机污染的指示生物以来,“指示种”层次的研究有了大量报道。然而,仅根据某物种的存在与否来判断污染状况有很大的局限,于是 Ejerdingstad^[8]提出了用整个藻类群落的种类组成和优势种群的变化来划分污染带,Hutchinson 和 Wetzel 总结了不同营养类型湖泊的藻类优势种群^[6]。嗣后,评价方法发展至群落水平,如以原生动物群落、底栖动物群落等的物种组成来对水资源进行评价^[9,10]。

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^[6],其数量大、种类组成复杂、生命周期短;它们在物质转化、能量流动、信息传递等生态过程中起着至关重要的作用,已成为水资源质量评价的重点对象^[11,12]。此前,作者以浮游生物为对象探索了 DNA 指纹分析在群落级生命系统应用的可行性^[13],并进而研究了浮游生物群落 DNA 多态性与富营养化的关系^[14],获知浮游生物群落 DNA 指纹与生物、非生物因子均存在着很好的相关性。本研究进一步研究浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系,以期通过群落遗传多样性这一基础层次来揭示生物多样性与环境理化因子的潜在关联,为建立简易、有效的水资源质量评价体系积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 采样点及样品采集 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——共 7 个采样点(图 1)。自表层至底层以 0.5m 的间隔用采水器在各水层采取 1L 水样经 25 号浮游生物网(孔径 0.064mm)过滤后收集于 50mL 塑料瓶,迅速用福尔马林液固定(甲醛 1%)。

收稿日期:2005-05-07;修订日期:2005-06-22

基金项目:国家自然科学基金(30490232);科技部 973 项目(2002CB412308);中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12)资助

作者简介:颜庆云(1979—),男,湖南衡阳人;硕士生;研究方向:浮游生物生态学

通讯作者:余育和, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

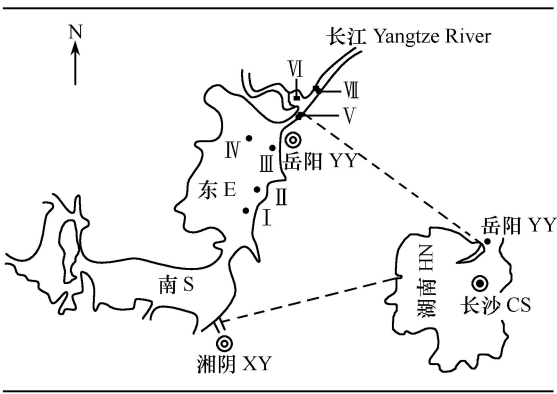


图 1 洞庭湖采样点位置图

Fig.1 Location of sampling sites in Dongting Lake

东—东洞庭湖 East Dongting Lake ;南—南洞庭湖 South Dongting Lake
HN—Hunan province ;CS—Changsha ;YY—Yueyang ;XY—Xiangyin

1.2 理化指标的测定 以 PHS-2F 型 pH 计直接读取 pH 值,实验室用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮 (TN) 和总溶解氮 (TDN),钼酸铵分光光度法测定总磷 (TP) 及总溶解磷 (TDP),泥沙含量通过重量法测得。

1.3 浮游生物群落 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 抽提参照 Coombs 等^[15]并加以适当改进:向浮游生物样品加入 100μL 0.5 % Tween-20,在热循环仪上加热至 90 并持续 10min;恢复至室温后加入 1μL 20mg/mL 的蛋白酶 K 在 55 的水浴中温浴 3h;加入 100μL 抽提缓冲液 (0.25 % Tween-20 , 0.025 % SDS , 10mmol/L Tris-Cl , 0.5mmol/L EDTA , pH8.0) 后在热循环仪上加热至 99 并保持 10min;恢复至室温后分别经酚 氯仿 异戊醇 (25 :24 :1) 和氯仿抽提后保存于 4 备用。

1.4 RAPD 扩增 以 站的浮游生物群落 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 四组共 80 条随机引物中筛选出扩增结果稳定、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。RAPD 扩增在 Perkin Elmer™ 9600 型 PCR 仪上进行,体系参照 Williams 等^[16]:25μL 体系中包含约 50ng DNA (各模板量基本保持一致) ,2.5μL 10 ×PCR buffer , 2.0μL 25mmol/L MgCl₂ , 1.0μL 2mmol/L dNTP ,1.5 ng 引物 , 1.25U Tap 酶 (MBI 公司产品) ,用灭菌双蒸水补足

25.0μL。混匀后稍离心将反应液集中于管底进行以下扩增:94 栅变性 5min,后接 45 个循环(每个循环依次包含 94 40s, 38 40s, 72 120s),然后 72 延伸 5min,反应终止于 4 。用 1.8 %的琼脂糖凝胶 (含 0.5μg/mL EB) 在 1 ×TAE 缓冲液中对扩增产物以 4V/cm(80V) 的电压进行电泳分离、UVP 凝胶成像分析系统观察并一次性成像。

1.5 数据处理 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。站点间理化因子的相似性聚类通过 SPSS 12.0 软件完成。

2 结果

2.1 理化分析

图 2 显示了 7 个采样站点理化指标的差异:其中 站的 TN、TDN 及 TP 含量都是最高的, 站的 TDP 含量最高: 站的泥沙含量比其他各站高得多,达 75.5mg/L;站点间的 pH 值相差不大,都呈弱碱性,其中 站碱性最强(pH 8.03)。

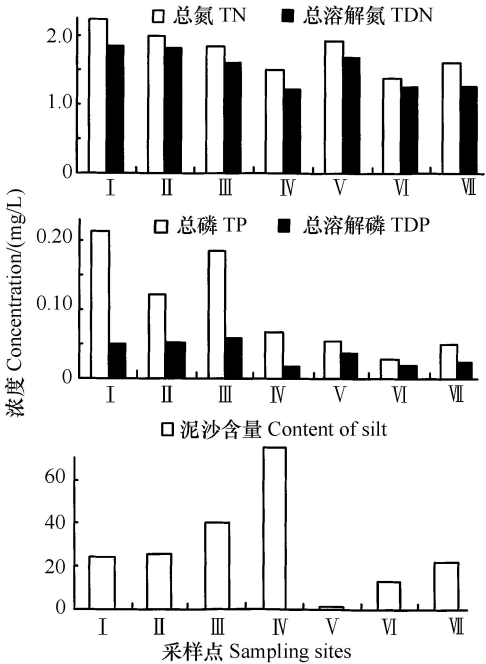


图 2 采样点间理化因子的差异

Fig.2 Discrepancy of the physico-chemical factors in different sampling sites

表 1 随机引物及其 RAPD 扩增结果
Tab.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 %
Total	——	180—2000	148	98.6 %

2.2 RAPD 指纹分析

RAPD 扩增图谱谱带清晰、多态性好(图 3),11 条随机引物共获得 148 条长度在 180—2000bp 的谱带,其中 98.6 %的为多态性带(表 1),26.4 %的谱带为特有带(仅出现在一个站点),惟有标记为 OPV19-

600 及 OPH12-450 的条带为各站的共有带,OPV19-450 及 OPV15-550 两条带在 7 个站中的 6 个站出现(表 2)。所用引物在各站可获得 45—70 条谱带,平均为 57.6,其中 站的扩增条带最少。

表 2 RAPD 标记 0/1 矩阵
Tab.2 Binary data matrix presence (1) and absence (0) of RAPD markers

采样点 Sampling sites	各引物的 RAPD 谱带 RAPD bands of each primer					
	OPV-20(16)	OPV-15(14)	OPM-12(14)	OPM-01(13)	OPV-07(12)	OPH-06(11)
	0000001000101001	01010101100000	00001101101000	1101101000100	001011110011	11011010100
	0011010101000000	00101111010000	00001001011000	0000100110010	000001000101	00000110100
	1111010101000000	00100100101100	00110100110110	0000111010000	101101001001	11011110100
	0000000010110110	00000101011101	00000000101000	0000000100100	000000110010	00001011010
	1011010011011000	00100101100000	01011010110100	0001111000010	101001010010	00101101000
	0110100110010011	00100011011000	10000011000101	1011111001011	010110111001	11010100001
	0000000110101101	10010110100010	00100101000100	0000111010100	100110011000	00111011100

采样点 Sampling sites	各引物的 RAPD 谱带 RAPD bands of each primer				
	OPH-20(15)	OPG-06(14)	OPG-07(14)	OPH-12(13)	OPV-19(12)
	000111010110010	01000110100110	01100010010000	1000000110110	001001010010
	000000101010100	00000100101001	00000101001000	0001011110100	010001100010
	101000101010000	00000011101001	00011110110011	1001010110100	000011101000
	000001001010101	00000000011101	00000001011100	0000011011101	000101110000
	010111100001010	11101010101000	00010110101100	0101010110100	010001101000
	001010101000110	01010101110110	01101010101000	0110111010000	000001100111
	001010101010011	00000000000110	10011110010000	0001101111000	100001100000

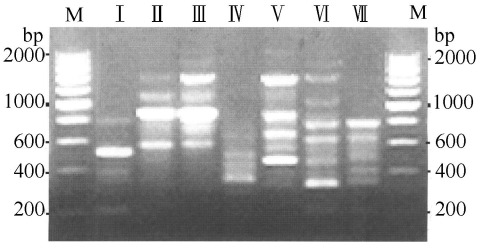


图3 OPV-20 引物 RAPD 电泳图谱
Fig. 3 RAPD profile generated using random primer OPV-20
M:200bp DNA Ladder; — : Sampling sites from to

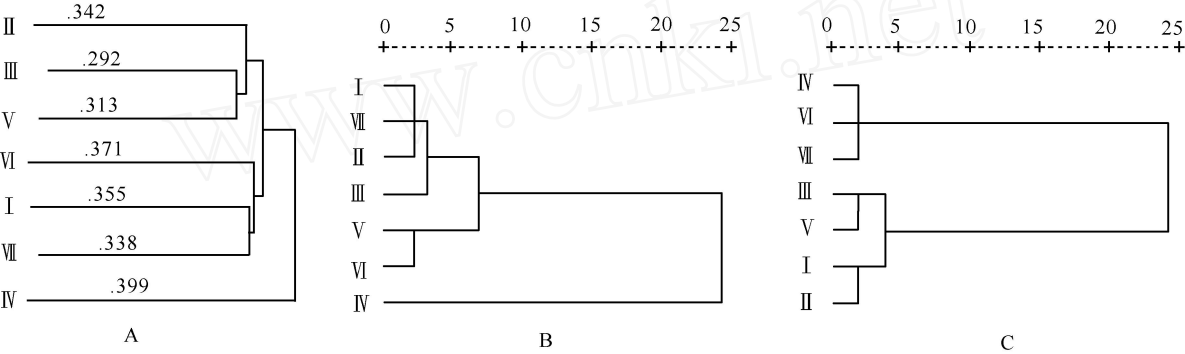


图4 采样点间的相似性聚类

Fig. 4 Similarity clustering among different sampling sites

A 基于 RAPD 标记 Based on the RAPD markers ;B 基于泥沙含量 Based on the content of silt ;C 基于理化因子 Based on the six physico-chemical factors

3 讨论

随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术不仅操作简便、费用低廉,而且能对研究对象作整体扫描分析——在模板 DNA 序列信息未知的情况下通过随机引物(通常为 10 个碱基长度)对整个模板进行随机扩增以检测其 DNA 多态性。该技术已被广泛用于遗传多样性研究,近期,作者将其拓展至群落级生命系统的研究并获得了有益的结果^[13,14]。为保证较好的重复性,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(图 3)。

业已明确,物种组成与环境因子密切相关,各类水体均存在着其特有的优势种及特定的物种组成;又有研究表明群落物种组成与群落 DNA 多态性是相关的^[13]。因此,可以认为物种多样性是联系群落遗传结构与环境因子的纽带,如若能跳过物种的桥梁作用找到它们间的直接关联,这将为水资源管理

2.3 聚类分析

基于 RAPD 指纹分析的 Neighbour-Joining 聚类图(图 4A)显示 站与其他各站的相似性最低,成为单独的一枝;、 站和、 站分别聚成一小类后马上聚为一大类。泥沙含量的 Ward's method (SPSS 12.0) 聚类(图 4B)与 RAPD 标记的聚类结果基本吻合—— 站作为单独的一枝完全有别于其他各采样点。而本研究中所测得的 6 个理化指标 (TN、TDN、TP、TDP、pH、泥沙含量) 综合的相似性聚类表明、 聚为一类,剩余的 4 个站点为另一类(图 4C)。

提供有力的依据。本研究中 RAPD 指纹分析获得的 148 条谱带带型聚类分析(图 4A)表明 站的浮游生物群落组成与其他 6 个站点存在显著的差异被聚为单独的一枝,这与站点间泥沙含量的相似性聚类结果(图 4B)是吻合的。同时,也与作者研究浮游生物群落 DNA 指纹与物种关系的聚类(未发表)是基本一致的。这都表明 DNA 指纹分析揭示的浮游生物群落 DNA 指纹是可信的。至于本研究所测的 6 个理化指标的综合聚类(图 4C)与前述聚类结果存在着较大的差异的原因可能有二:(1)泥沙含量是东洞庭湖的浮游生物群落的主要限制因子,而 TN、TDN、TP、TDP、pH 的影响不大。这可从窦鸿身等^[17]的研究获得佐证,他们认为洞庭湖由于湖水泥沙含量高、透明度低,浮游生物数量及生物量相对长江中下游其他湖泊低。高含沙量确实已成为洞庭湖的一大水文特征,是湖盆急剧萎缩的根本原因;含沙量同时又是影响入水光强的主要因素,高浓度的泥沙也导致了透明度降低,从而影响了浮游生物的分布与生存。(2)由于本研究所采水样为瞬时水样,采样当时的自

然或人为因素(如风力、水流的搅动作用)可能导致所采水样不能完全代表采样点的特征;同时,常规测量方法的测定误差也有可能导致了差异的产生,尤其是 TP、TDP 由于本身含量低(0.0168—0.2127mg/L),误差的影响更大(如单独用 TP、TDP 数据的聚类与其他聚类结果差别很大)。因此,含沙量是本研究所测的 6 个指标中限制东洞庭湖浮游生物分布的主要环境因子。

综上所述,利用 DNA 指纹技术分析各类水体浮游生物群落遗传结构、进而研判所获得 DNA 指纹与制约浮游生物分布的主要理化因子的关系并建立相应的关系模型,这将为建立简易、有效的水环境评价体系积累很好的基础资料。

参考文献:

- [1] Moraes D S, Jordao B Q. Water resources deterioration and its impact on human health[J]. *Rev. Saude. Publica.*, 2002, **36**(3): 370—374
- [2] Vorosmarty C J, Green P, Salisbury J, et al. Global water resources: vulnerability from climate change and population growth[J]. *Science*, 2000, **289**(5477): 284—288
- [3] Payet R, Obura D. The negative impacts of human activities in the eastern African region: an international waters perspective[J]. *Ambio*, 2004, **33**(1-2): 24—33
- [4] Micklin P P. Man and the water cycle: challenges for the 21st century[J]. *GeoJournal*, 1996, **39**(3): 285—298
- [5] Gleich P H. Water in crisis: paths to sustainable water use[J]. *Ecological Application*, 1998, **8**(3): 571—579
- [6] Shen Y F, Zhang Z S, Gong X J, et al. Modern biomonitoring techniques using freshwater microbiota[M]. Beijing: China Architecture and Building Press. 1990[沈韞芬,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]
- [7] Kolkwitz R, Marsson M. Ökologie der pflanzliche saprobien[J]. *Ber. dt. bot. Ges.*, 1908, **26**: 505—519
- [8] Fjerdningstad E. Microbial criteria of environment qualities. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1971, **25**: 563—582
- [9] Song B Y. Ecological studies on the protozoans at the Dongting Lake Outlet of the Changjiang River[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 317—321.[宋碧玉.长江洞庭湖湖口原生动物的生态学研究.水生生物学报,2000, **24**(4): 317—321]
- [10] Dai Y Z, Tang S Y, Zhang J B. The distribution of zoobenthos species and bio-assessment of water quality in Dongting Lake[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, **20**(2): 277—282[戴友芝,唐受印,张建波.洞庭湖底栖动物种类分布及水质生物学评价.生态学报,2000, **20**(2): 277—282]
- [11] Lin Q Q, Hu R, Duan S S, et al. Reservoir trophic states and the response of plankton in Guangdong Province[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(6): 1101—1108[林秋奇,胡韧,段舜山,等.广东省大中型供水水库营养现状及浮游生物的响应.生态学报,2003, **23**(6): 1101—1108]
- [12] Savin M C, Martin J L, LeGresley M, et al. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods[J]. *Microb. Ecol.*, 2004, **48**(1): 51—65
- [13] Yu Y H, Zhang W J, Yan Q Y. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 457—463[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]
- [14] Yan Q Y, Yu Y H, Zhang W J. The DNA polymorphism of plankton community and eutrophication in Lake Donghu, Wuhan[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, **25**(3): 461—465[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]
- [15] Coombs N J, Gough A C, Primrose J N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27**(16): e12—17
- [16] 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
- [17] Du H S, Jiang J H. Dongting Lake[M]. Hefei: University of Science and Technology in China Press, 2000[窦鸿身,姜加虎.洞庭湖.合肥:中国科学技术大学出版社,2000]

RELATIONSHIP BETWEEN DNA FINGERPRINTING OF PLANKTON COMMUNITY AND PHYSICO-CHEMICAL FACTORS

YAN Qing-Yun^{1,2}, YU Yr-He¹, FENG Wei-Song¹, LIANG Xiao-Min¹ and XIE Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract :Water resources are of great importance in maintaining the sustainable development of natural resources. However, with the rapid increase of population and economy, pollution leads to water crisis and other challenges on aquatic ecosystem. Therefore, how to assess water quality rapidly and accurately and maintain the health of aquatic ecosystem has become the focus for ecological study.

In order to offer facilities and accumulate basic data for water quality assessment, this paper studied the relationship between genetic information of plankton community and the major environmental factors. The physico-chemical factors of seven sampling stations in Eastern Dongting Lake were measured with general methods and the DNA polymorphism of plankton community was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Then, their relationship was assessed with cluster analysis. The results were: (1) 11 of 80 screened random primers used in the study generated a total of 148 observable RAPD bands and 98.6% of which were polymorphic bands; the number of amplified bands at different sampling stations ranges from 45 to 70, the mean number was 57.6 and the station got the minimum; (2) the content of silt at station was the highest (75.5 mg/L) and the other stations were from 1.2 to 40.3 mg/L; the discrepancy of other five factors measured in the investigation were not obvious in different stations. Cluster analysis based on RAPD markers and the major environmental factor showed that DNA fingerprinting of plankton community was correspondent to the content of silt. And the seven sampling stations could be grouped into two clusters: the station was a single cluster and another cluster consists of the other six stations.

In conclusion, the DNA fingerprinting of plankton community was closely related to the environmental physico-chemical factors that mainly restrict the distribution of planktonic organisms, and the data of such kind accumulated will play an important role in constructing one handy and effectual system for water quality assessment.

Key words :Plankton; RAPD; DNA fingerprinting; Physico-chemical factors; Dongting Lake