

三峡库区浮游生物群落结构与 DNA 多态性比较分析*

邓文娜^{1,2}, 余育和^{1**}, 冯伟松¹, 颜庆云^{1,2}, 宋晓红^{1,2}, 刘志新^{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:以三峡库区所设 A、B、C、D、E、F 和 G 等 7 个站点为研究区域, 利用 RAPD 技术就其浮游生物群落遗传多样性与物种多样性的关系进行了探索性研究. 共鉴定出浮游生物 41 种, 其中藻类 4 种, 原生动物 10 种, 轮虫类 19 种, 枝角类 4 种, 桡足类 4 种. 物种组成相似性最高的是 B 站和 C 站, 最低的是 A 站和 F 站. 而站点间浮游生物群落遗传距离分析表明: 相距最近的是 C 站与 D 站, 最远的为 D 站与 F 站. 树状聚类图也显示: 各站点物种组成聚为一类; 而 DNA 多态性 RAPD 最先聚在一起的是 B 与 F, 它们的对应枝由 A、C、D、E 构成, G 单独成为一枝. 研究表明, 所发现的物种组成与所揭示的遗传多样性并未完全吻合. 这或许是物种信息的缺失(如藻类与细菌), 或许是 RAPD 技术的缺陷, 或许两者所致. 因此, 本研究积累了三峡库区浮游生物群落遗传多样性的一些背景资料, 而要阐释浮游生物群落遗传多样性与物种多样性之间的相互关系则有赖于应用灵敏的、重复性好的, 且能分别分析原核和真核生物的 DNA 分子标记技术.

关键词: 三峡库区; 浮游生物; RAPD; 遗传多样性; 物种多样性

Comparative analysis between species composition and DNA polymorphism of plankton community in the Three-Gorges Reservoir region

DENG Wenna^{1,2}, YU Yuhe^{1**}, FENG Weisong¹, YAN Qingyun^{1,2}, SONG Xiaohong^{1,2} & LIU Zhixin^{1,2}

(1: *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China*)

(2: *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, P. R. China*)

Abstract: Recently, molecular ecology has been appearing to increasing attention, many kinds of molecular methods were applied in this field. In addition, various experts have been interesting in the Three-Gorges Reservoir region (TGRR) and even the whole Yangtze drainage basin after the beginning of dam engineering. However, few studies were focused on the molecular ecology of TGRR. In order to explore the relationship between genetic diversity and species diversity, the whole DNA of plankton communities from seven samples locations in the TGRR was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD), and species of which were identified as well. The 7 locations can be clustered into 3 groups by genetic diversity. Station A, C, D and E cluster as one group, station B and F cluster as another group, and station G is different from all of others. While these stations still as a whole after analyzing by RAPDistance1.04. Also, 41 species were found in all, which contains 4 algae, 10 protozoa, 19 rotifer, 4 cladocera and copepoda respectively. Meanwhile, the nearest genetic distance is only 0.2586 which occurred between station D and C, and the opposite one lies between D and F which is 0.4758. But species diversity analysis displays that station B and C have the nearest distance; correspondingly, A and F have the furthest one. In other words, the result of genetic diversity is not consistent with that of species diversity. Therefore, more information has been obtained from genetic diversity in river, which applied new information for establishing the relationship between genetic diversity and species diversity of plankton. And more molecular biological methods should be applied, such as that more sensitive as well as good replied approaches could analyze pronucleus and eukaryon re-

* 国家自然科学基金项目(30570240,30490232)和国家“973”计划(2002CB412308)联合资助. 2006-09-30 收稿; 2007-02-25 收修改稿. 邓文娜,女,1982年生,硕士研究生;E-mail: dengwenna@163.com.

** 通讯作者;E-mail: yhyu@ihb.ac.cn.

spectively.

Keywords: Three-Gorges Reservoir Region(TGRR); plankton; RAPD; genetic diversity; species diversity

三峡大坝位于水流湍急的长江上游下段, 水库面积 58000 km²^[1], 它的修建巨大地开发了长江的水能资源, 同时也对生态和环境造成了影响. 近年来, 针对三峡水库库区的研究正在向前发展, 领域涉及地质学^[2]、土壤^[3]和土壤微生物学^[4], 以及三峡大坝对水质^[5]、河口生物^[6,7]、特有鱼类和生物多样性等方面的影响^[8], 但鲜有研究报道利用分子生物学方法对三峡库区的浮游生物群落进行分析.

现代分子生物学的飞速发展, 使其不断渗透到生命科学的各个领域. 而 DNA 分子技术以其可靠性和高效性, 更容易从分子水平上进行标记, 以用于遗传育种、种质鉴定及生物多样性等工作. 从 1974 年 Grodzicker 创立第一个 DNA 分子标记技术——限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)技术以来, 各种各样的分子标记技术应运而生, 并被逐渐引入到微生物群落分析. 如变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)快速、简便, 即使某些物种含量低也能定性、半定量地反映群落结构^[9]; 单链构象多态性技术(Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)检验灵敏度高, 无假阳性结果等^[10]. 近几年来, 余育和及颜庆云^[11-14]等研究人员又将 RAPD 技术拓展到浮游生物群落研究, 应用了该技术操作简便、实验周期短、引物具有普遍适用性等特点, 以探讨浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种组成及环境因子之间的关系. 本文就是采用 RAPD 分子标记技术, 对三峡库区的浮游生物群落进行 DNA 多态性分析, 并结合物种多样性资料以期深化探讨 DNA 分子标记技术与物种组成之间的联系.

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验水样于 2006 年 4 月 1-3 日采自长江三峡库区, 采样点 B、C、D、E、F、G 分布于长江干流上, A 位于其支流香溪河(图 1). 用 25 号(网孔 64 μm)浮游生物网捞取表层水样于 50 ml 塑料瓶中, 将用于 DNA 提取的水样存于 4℃ 冰箱, 同时用 5% 甲醛固定用于物种鉴定的水样.

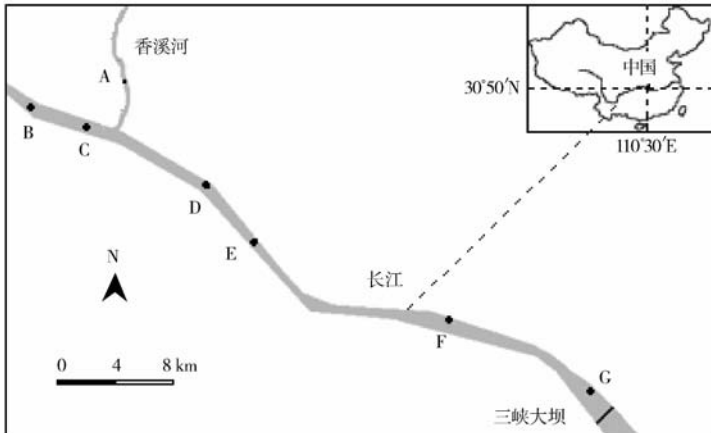


图 1 三峡库区采样点分布

Fig. 1 Samples locations of the Three-Gorges Reservoir region

1.2 物种鉴定

在 Zeiss Axioplan 2 Imaging 显微镜(200×)下对浮游生物种类进行鉴定, 大多数鉴定到属或种.

1.3 DNA 提取

将冷藏水样以 10000 转/min 离心 10 min, 弃上清并用灭菌双蒸水清洗 2 次. 向沉淀中加入 400 μl 裂解液(0.5% SDS; 10 mM Tris-Cl, pH = 8.0; 0.1M EDTA, pH = 8.0; 蛋白酶 K, 100 μg/ml), 于 55℃ 水浴过

夜. 用常规的苯酚: 氯仿法抽提 DNA, 并保存于 TE 中备用。

1.4 RAPD 扩增

以 Opeon 公司的 OPM、OPG 引物进行 RAPD 扩增. 筛选出扩增条带清晰且多态性明显的 OPM-3、OPM-4、OPM-6、OPM-7、OPM-11、OPM-13、OPM-14、OPG-2、OPMG-3、OPG-10、OPG-16 为最终反应引物. 反应参照 Williams 等^[15], 并以正交法(L₉(3⁴)型)对反应体系中起重要作用的 DNA、dNTP、Mg²⁺ 以及引物含量进行筛选. 确定最终实验反应体系为: Mg²⁺ 1.5 mmol/L、dNTP 48 μmol/L、引物 14 pmol、DNA 约 30 ng.

经过对循环参数的优化选定, 在 Perkin Elmer™9600PCR 仪上进行以下循环: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 50 s, 38℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 3 min, 循环 40 次; 72℃ 延伸 10 min; 反应终止于 4℃. 采用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检验, 并取像于 UVP 凝胶成像系统. 重复 RAPD 扩增两次以上, 并且在每次 UVP 凝胶成像系统成像时, 都以不同亮度对凝胶块进行多次拍照.

1.5 数据处理

根据 DNA Marker DL 2000(宝生物工程(大连)有限公司提供)的指示位置估计各扩增片段大小. 运用 LabWorks™软件扫描分析 RAPD 扩增图谱, 分别以 1,0 代表条带的有、无, 建立二元矩阵. 利用 RAPDistance1.04 程序对结果进行聚类分析, 同时采用 Nei & Li^[16] 提供的方法计算遗传距离. 物种组成数据最终转化为 1,0 矩阵(1 代表存在该物种, 0 代表不存在该物种), 然后将矩阵导入 SPSS 13.0 软件进行聚类分析.

2 结果

2.1 物种鉴定结果

7 个站点共发现 41 种浮游生物(表 1), 其中藻类 4 种, 原生动物 10 种, 轮虫类 19 种, 枝角类 4 种, 桡足类 4 种. 19.5% 的种类存在于全部观测站点, 26.8% 存在于 6 个站点, 24.4% 存在于 4 个或 5 个站点. 将各站点两两之间共同种数进行统计, 显示 B、C 之间拥有最大值, 为 25 种; A、F 之间为最小值, 14 种.

经 SPSS13.0 软件分析, 7 个站点的物种几乎在 0 附近就聚为一类(图 2), 表明单从浮游生物物种组成来看各站点的差别不大.

表 1 浮游生物物种多样性(1 代表存在该物种, 0 代表不存在)

Tab.1 Biodiversity of zooplankton (1 stands for presence, 0 stands for absence of species)

物种	A	B	C	D	E	F	G
藻类 algae							
实球藻 <i>Pandorina morum</i>	0	1	1	1	1	1	1
空球藻 <i>Eudorina elegans</i>	1	1	1	1	1	1	1
具角角甲藻 <i>Ceratium cornutum</i>	1	1	1	1	1	0	0
椭圆形多甲藻 <i>Peridinium umbonatum</i>	1	1	0	1	1	1	1
原生动物 Protozoa							
小单体环栉毛虫 <i>Didinium balbianii</i>	1	1	1	1	0	1	1
双环栉毛虫 <i>Didinium nasutum</i>	1	0	1	1	1	1	1
钟虫 <i>Vorticella</i> sp.	0	1	1	0	0	1	0
独缩虫 <i>Carchesium</i> sp.	1	1	1	1	1	1	1
浮游累枝虫 <i>Epistylis rotans</i>	1	1	0	1	1	0	0
绿急游虫 <i>Strombidium viride</i>	0	1	0	1	0	0	0
喇叭虫 <i>Stentor</i> sp.	1	0	0	1	0	1	0
直半眉虫 <i>Hemiphrys proceras</i>	0	0	0	0	1	0	1
钩刺斜管虫 <i>Chilodonella uncinata</i>	0	1	0	0	0	0	0
草履虫 <i>Paramecium</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0
轮虫 Rotifera							
椎尾水轮虫 <i>Epiphanemes senta</i>	1	1	1	1	1	1	1

螺形龟甲轮虫 <i>Keratella cochlearis</i>	1	1	1	1	1	0	1
曲腿龟甲轮虫 <i>Keratella valga</i>	1	1	1	1	0	0	0
壶状臂尾轮虫 <i>Brachionus urceus</i>	0	0	1	1	0	0	1
长枝多枝轮虫 <i>Polyarthra dolichoptera</i>	1	1	1	1	1	1	1
疣毛轮虫 <i>Synchaeta</i> sp.	1	1	1	1	1	1	1
广生多枝轮虫 <i>Polyarthra vnlgaris</i>	0	1	1	1	1	0	1
晶囊轮虫 <i>Asplanchna</i> sp.	0	1	1	1	1	1	1
矩形龟甲轮虫 <i>Keratella quadrata</i>	1	1	1	1	1	0	1
萼花臂尾轮虫 <i>Brachionus calyciflorus</i>	1	0	1	1	1	1	1
<i>Keratella ticinensis</i>	1	1	1	0	1	1	1
<i>Keratella serrulata</i>	1	1	1	1	1	1	1
长三枝轮虫 <i>Filinia longiseta</i>	1	1	1	1	1	0	1
月形腔轮虫 <i>Lecane luna</i>	0	0	1	0	0	0	0
前节晶囊轮虫 <i>Asplanchna priodonta</i>	1	1	1	1	1	0	1
腹尾轮虫 <i>Gastropus</i> sp.	0	1	1	1	1	0	0
狭甲轮虫 <i>Colurella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1
鞍甲轮虫 <i>Lepadella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1
蛭态类轮虫 <i>Bdelloidea</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0
枝角类 Cladocera							
颈沟基合溞 <i>Bosminopsis deitersi</i>	1	1	1	0	1	0	1
长额象溞 <i>Bosmina longirostris</i>	1	1	1	1	1	1	1
中型尖额溞 <i>Alona intermedia</i>	0	1	1	1	1	1	0
船卵溞 <i>Scapholeberis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1
桡足类 Copepoda							
无节幼体 Nauplius	1	1	1	1	1	1	1
剑水蚤 Cyclopoida	1	1	1	1	0	0	1
哲水蚤 Calanida	0	1	1	0	1	0	1
猛水蚤 Harpacticoida	0	0	1	0	1	1	1

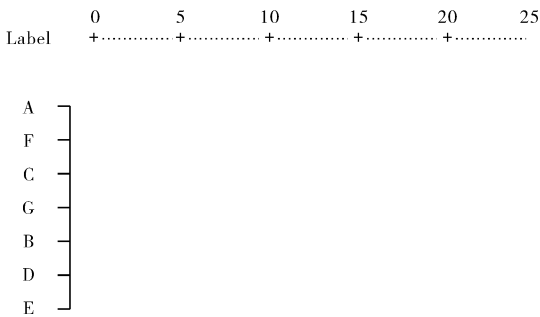


图2 物种多样性聚类分析结果

Fig. 2 Results of clustering analysis of species diversity

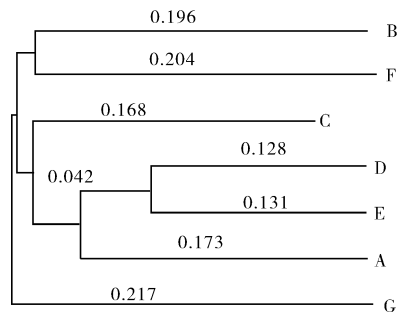


图3 RAPD 聚类分析结果

Fig. 3 Results of clustering analysis of RAPD

2.2 RAPD 扩增

以筛选的 11 条随机引物对 DNA 进行扩增, 共得到 100 条扩增谱带, 多态性位点为 92%。引物 OPG-13 扩增的条带最少, 为 7 条; 而引物 OPM-3、OPM-6、OPG-2、OPG-10 以及 OPG-16 均扩增出了 10 条清晰明亮的带谱(表 2)。就每个多态位点而言, 多态性条带对站点的区分度并不都那么高, 即有很多条带同时存在于多个站点。虽然扩增了 10 条只存在于一个站点的条带, 但引物 OPM-3、OPM-4、OPM-6、OPM-14、OPG-3、OPG-10 都扩增出了多态性为 0 的条带(该条带存在于每个站点), 其中 OPG-3 扩增了 3 条多态性为 0 的条

带,同时也扩增了 11 条只在一个站点不存在的条带.

表 2 各样点扩增结果(1 代表有条带, 0 代表无条带)

Tab. 2 Amplified results of samples (1 stands for bands, 0 stands for no bands)

	OPM-3	OPM-4	OPM-6	OPM-7	OPM-11	OPM-13	OPM-14	OPG-2	OPG-3	OPG-10	OPG-16
A	1101101100	0101101000	0110110101	1111001111	1111010111	11010000	0110101110	1011010110	11101110	0111110000	1001010100
B	0010111110	0111110011	1111101110	0001001110	1100111111	00101110	0011101111	0011000001	11010111	0101111000	0011111011
C	0110011110	0101101110	0111111011	0100111000	111010010	00010111	010100010	0001010100	11101110	000111101	0001011100
D	1001101100	1111110000	0101100111	000011010	101101110	01011110	010100110	0011110100	11001110	110101011	0111111110
E	1001011110	1001111110	0111000011	111001010	101101111	11011010	011101010	0011001100	11101110	110110010	0101100110
F	0000010111	0010101111	0100010110	010101011	101001110	00111011	101101010	0001010100	1110010	011101100	0100001111
G	0010101101	0001101000	0101000101	010100111	011010101	00110010	010011010	0100100100	11011110	001101100	0001010110

经对 RAPD 图谱的聚类显示 7 个样点可以分为 3 组(图 3), D 站和 E 站首先聚到一组, 然后与 A 站聚到一起, 最后与 C 站聚成一大类; B 站和 F 站聚成一大类; 而站点 G 独自归于一类. 从遗传距离来看(表 3), 最先聚到一起的 C 站和 D 站为 0.2586, 相距最远的 D 站与 F 站为 0.4758, 平均遗传距离为 0.3958.

表 3 RAPD 聚类分析各样点距离矩阵

Tab. 3 Distance matrix of samples about RAPD clustering analysis

	A	B	C	D	E	F
A	0					
B	0.375000	0				
C	0.372881	0.363636	0			
D	0.440678	0.381818	0.258621	0		
E	0.400000	0.392157	0.425926	0.370370	0	
F	0.428571	0.402062	0.456311	0.475728	0.431579	0
G	0.440678	0.363636	0.362069	0.327586	0.462963	0.378641

3 讨论

本文对三峡库区 7 个站点物种进行的定性分析结果表明, 无论是支流香溪河站点, 还是长江干流站点, 各站点物种差异不大, 多样性不高. 这个结果与谢平等^[17]的观点一致, 即三峡大坝工程的直接结果是导致水体生物多样性的降低. Wu 等^[1]也认为大坝工程将大大改变长江原先的生物多样性和生态系统结构. 在三峡蓄水工程以前, 没有有关香溪河发生水华的报道, 但 2004 年 Zeng 等^[18]发现香溪河发生尖尾蓝隐藻(*Chroomonas acuta*)水华. 这些表明大坝工程确实影响了大坝上游的回水区, 造成其浮游生物物种多样性很低, 最终出现物种聚类分析归为一类的结果. 在遗传多样性分析中, 为得到最佳实验结果, RAPD 扩增至少重复了两次以上, 且在每次 UVP 凝胶成像系统成像时, 都以不同亮度对凝胶块进行多次拍照, 将因 RAPD 造成的实验误差降到最低, 最终得到各站点聚为三大类的分析结果.

对库区浮游生物物种多样性与遗传多样性进行比较, 发现物种组成相似性最高的是 B 站和 C 站, 最低的是 A 站和 F 站; 而站点间遗传距离分析表明相距最近的是 C 站与 D 站, 最远的为 G 站与 E 站. 树状聚类图也显示: 各站点物种组成聚为一类; DNA 多态性 RAPD 则将各站点聚为三大类. 表明浮游生物遗传多样性与物种多样性之间存在差异, 该结论不同于颜庆云等^[19-22]的观点. 在物种多样性分析中, 可能会漏掉一些生物量极少的藻类, 但笔者认为不会对本实验的结果造成实质性的影响, 因为对于 PCR 扩增而言, 各物种 DNA 在同一反应体系中对引物和反应底物有竞争作用, 而相对优势的种类往往在竞争中获胜^[23],

即在其他条件一定的情况下,只有当 DNA 的浓度达到一定值时才能获得相应的扩增谱带^[22];另一方面,RAPD 技术反应易受外界因素影响,重复性不太令人满意,同时不能分别对原核及真核生物进行分析,这也可能对遗传多样性分析造成一定影响。

综上所述,三峡库区浮游生物遗传多样性没有完全反映物种多样性,即 DNA 分子标记分析结果与传统的浮游生物物种结构的分析结果存在差异,这或许是物种信息的缺失,更可能是 RAPD 技术本身的缺陷,也可能两者所致。因此,本研究积累了三峡库区浮游生物群落遗传多样性的一些背景资料,而要阐释浮游生物群落遗传多样性与物种多样性之间的相互关系则有赖于应用灵敏的、重复性好的、且可以分别分析原核与真核(去除细菌影响)生物的 DNA 分子标记技术。

4 参考文献

- [1] Wu J G, Huang J H, Han X G *et al.* Three-Gorge Dam-experiment in habitat fragmentation? *Science*, 2003, **300**: 1239 – 1240.
- [2] Sun J, Hu Y Y. Time-dependent effects on the tensile strength of saturated granite at three gorges project in China. *Soil Dyn Earthq Eng*, 1997, **16**: 385 – 394.
- [3] Cai Q G, Wang H, Curtin D *et al.* Evaluation of the EUROSEM model with single event data on Steeplands in the Three Gorges Reservoir Areas, China. *Catena*, 2005, **59**(1): 19 – 33.
- [4] Yan T M, Yang L Z, Campbell C D. Microbial biomass and metabolic quotient of soils under different land use in the Three Gorges Reservoir area. *Geoderma*, 2003, **115**(1 – 2): 129 – 138.
- [5] 刘瑞秋. 三峡大坝截流前后长江中上游江段水华学特征的初步调查. *水生生物学报*, 2000, **29**(5): 446 – 450.
- [6] Gao X L, Song J M. Phytoplankton distributions and their relationship with the environment in the Changjiang Estuary, China. *Mar Pollut Bull*, 2005, **50**(3): 327 – 335.
- [7] 单秀娟, 线薇薇, 武云飞. 三峡工程蓄水前后秋季长江口鱼类浮游生物群落结构的动态变化初探. *中国海洋大学学报*, 2005, **35**(6): 936 – 940.
- [8] 虞孝感. 长江流域可持续发展研究. 北京:科学出版社, 2003: 359 – 368.
- [9] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNA. *Appl Environ Microb*, 1993, **59**(3): 695 – 700.
- [10] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR Single-Strand-Conformation Polymorphism. *Appl Environ Microb*, 1996, **62**(9): 3112 – 3120.
- [11] 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.
- [12] 颜庆云, 余育和, 冯伟松. 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. *生态学报*, 2005, **25**(9): 2221 – 2226.
- [13] 颜庆云, 余育和, 冯伟松等. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与理化因子的关系. *水生生物学报*, 2005, **29**(6): 601 – 605.
- [14] 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] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* DNA polymorphism s amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, **18** (22): 6531 – 6535.
- [16] Nei M., Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 5269 – 5273.
- [17] Xie P, Wu J G, Huang J H *et al.* Three-Gorges Dam: risk to ancient fish. *Science*, 2003, **302**: 1149 – 1151.

- [18] Zeng H, Song L R, Yu Zh G *et al.* Distribution of phytoplankton in the Three-Gorge Reservoir during rainy and dry seasons. *Sci Total Environ*, 2006, **367**(2-3), 999-1009.
- [19] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S *et al.* DNA polymorphism of the plankton community and its relationships to species composition in the Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River. *J Freshw Ecol*, 2006, **21**(3): 385-390.
- [20] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S. Genetic fingerprinting of plankton community provides new insights into aquatic ecology. *Prog Nat Sci*, 2006, **16**(9): 893-898.
- [21] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S *et al.* Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu. *Microb Ecol*, 200(In press).
- [22] 颜庆云, 舒少武, 余育和等. 转基因鱼试验湖浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与优势种的关系. *自然科学进展*, 2006, **16**(7): 889-893.
- [23] Boon N, Marle C, Top E M *et al.* Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. *Appl Microbiol Biotech*, 2000, **53**(6): 742-747.