

不同引物扩增对东海陆架沉积物真核微型生物多样性的影响*

俞凯成¹ 王健鑫¹ 陶诗¹ 刘明华¹ 蒋然¹ 刘雪珠¹ 黄备²

(1. 浙江海洋学院海洋微生物分子生态与应用实验室 舟山 316022; 2. 浙江省舟山海洋生态环境监测站 舟山 316021)

提要 采用三对通用引物(ITS1/ITS4, EF3/EF4, NS1/NS4)检测其对东海陆架 DH-13 站点表层沉积物真核微型生物的扩增特异性和多样性差异。对 323 个有效克隆子进行 OTU 分型和多样性分析, 结果表明, NS1/NS4 引物扩增所获得的文库多样性最高, EF3/EF4 其次, ITS1/ITS4 最后。通过 NCBI 比对和分类学研究, 发现优势种群主要为原生生物界, 包括丝足虫门(Cercozoa, 占有 OTU 的 36.4%)、横裂甲藻纲(Dinophyceae, 占 14.2%)、不等鞭毛门(Stramenopiles, 占 7.4%)和纤毛虫门(Ciliophora, 占 6.3%); 另含部分真菌界如子囊菌门(Ascomycota, 占 7.4%)和壶菌门(Chytridiomycota, 占 6.3%)。原生生物方面, NS1/NS4 引物表现的多样性最高, 适合于扩增丝足虫门、横裂甲藻纲和不等鞭毛门, 并扩增到独有的眼虫门(Euglenozoa)、隐藻门(Cryptophyta)和顶复门(Apicomplexa); ITS1/ITS4 适合于扩增甲藻和纤毛虫门; EF3/EF4 则适合于丝足虫门。真菌方面, ITS1/ITS4 适合于扩增子囊菌门; EF3/EF4 适合于子囊菌门和壶菌门, 而 NS1/NS4 适合于壶菌门。系统发育分析表明, 三对引物的原生生物系统树中的相似序列多来自海洋环境样品, 真菌序列则分别来自陆地土壤真菌和海洋真菌, 说明三对引物更适用于海洋沉积环境微型原生生物分子生态分析。

关键词 真核微型生物; 多样性; 引物; 18S rDNA; ITS

中图分类号 Q933 **doi:** 10.11693/hyhz20140500152

海洋沉积物覆盖了超过地球表面 2/3 的面积, 是海洋生态系统的重要组成部分, 更是地球上主要的微生物栖息地(Whitman *et al.*, 1998)。由于海底沉积物的特殊地理环境, 其中的微生物往往具有一些适应其环境的形态学、生理学、遗传学上的特异性(戴欣等, 2001), 同时沉积物微生物还在整个海洋生态系统的生物地球化学循环过程中发挥着重要的作用(Köster *et al.*, 2008), 因此了解海洋沉积物微生物群落结构和多样性有着重要的意义。

东海是西太平洋构造活动带中一个大型边缘海, 处于 21°54'—33°17'N, 117°05'—131°03'E 之间, 是西太平洋沟-弧-盆体系的典型发育地区(李家彪, 2008)。东海不仅有着多样的水文条件、显著的物理化学梯

度、显著的季节差异, 同时有很高的初级生产力, 是碳和其它物质在全球生物地球化学循环的重要场所, 也是研究海底各种沉积作用和微生物群落多样性的有利场所(王健鑫等, 2012)。东海陆架沉积环境微生物多样性的研究多集中在细菌(宋志刚等, 2006; Zeng *et al.*, 2007; 王健鑫等, 2012)和古菌(张林宝等, 2010)等原核生物, 对于真核微型生物多样性的研究较少(Park *et al.*, 2008), 同时分析方法也比较单一, 导致对于东海沉积环境真核微型生物缺乏系统科学的了解。

在真核微型生物分子多样性研究中, 18S rDNA 是最常用的靶标基因之一, 既可针对保守区进行引物设计, 又可根据可变区来区分不同种真核生物的差异(汪岷等, 2009); 另外核糖体基因间隔区(ITS

* 国家自然科学基金面上项目, 31270160 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12C03003 号; 浙江省环保厅科研项目, 2012A033 号, 2013A020 号。俞凯成, 硕士研究生, E-mail: 896731796@qq.com

通讯作者: 王健鑫, 高级实验师, E-mail: zswjx2575@163.com

收稿日期: 2013-11-06, 收修改稿日期: 2014-01-12

区)也是常用的靶标基因, 由于其进化速率较快, 被认为比较适合在较小的分类阶元层次进行鉴定和多样性分析(Rodríguez *et al*, 2005)。在对真核微生物分子多样性进行研究时, 应根据各个靶标基因的特点来综合分析, 以增加结果准确性, 虽然针对陆生环境已有部分不同引物扩增效果的比较研究(Anderson *et al*, 2003), 但在海洋沉积环境中不同引物扩增微型真核生物的相关比较研究尚未涉及。

本文以东海陆架 DH-13 站点沉积物为研究对象, 选择三对真核微生物的通用引物(NS1/NS4、EF3/EF4、ITS1/ITS4), 通过 18S rDNA、ITS 区的基因克隆和文库构建, 进行分类学、多样性和系统发育分析, 以期对海洋沉积物真核微生物多样性研究的引物选择提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本文分析所用的沉积物样品是 2007 年 4—5 月海洋调查项目所采集的 DH-13 号沉积物柱表层样品, 采样点坐标为(31°30.103'N, 123°29.844'E), 水深 40m, 位于东海陆架长江古河口区。样品采集后立即将 0—10cm 的沉积物柱芯以 3cm 为单位分为 4 层, 分装于无菌样品袋中, -20°C 保存, 后放置于实验室-80°C 超低温冰箱中长期保存, 沉积物以中细砂为主。

1.2 样品总 DNA 的提取与纯化

利用 FastPrep[®]-24 快速核酸提取仪(MP Biomedicals 公司)和 FastDNA spin kit for soil 试剂盒进行 DNA 提取, 核酸蛋白检测仪(Bio-Rad 公司)测定 DNA 浓度和纯度, 纯化后用于 PCR 扩增。

1.3 PCR 扩增和产物回收

将上述总 DNA 在梯度 PCR 仪(Biometra 公司)中进行扩增, 扩增采用通用引物 ITS1/ITS4、NS1/NS4 和 EF3/EF4, 见表 1 所示。50 μ L PCR 扩增体系: DNA 模板 2 μ L, 顺反引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L, 10 \times PCR buffer (含 MgCl₂, 1.5mmol/L) 5 μ L, rTaq 聚合酶(5U/ μ L) 1 μ L, 双蒸水补足至 50 μ L。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 4min; 94°C 变性 30s, 50°C 退火 30s, 72°C 延伸 60s, 循环 35 次; 最后 72°C 延伸 10min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 并用 DNA 胶回收试剂盒(QIAGEN 公司)回收产物。

1.4 克隆和测序

PCR 回收产物与 pMD-18T vector (TaKaRa 公司)在 16°C 连接过夜, 将连接产物转化到大肠杆菌(*E.*

表 1 三对通用引物的详细信息

Tab.1 Particular information of three universal primers

引物	引物序列(5' 3')	参考文献
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	White <i>et al</i> , 1990
NS4	CTTCCGTCAATTCTTTAAG	
EF3	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	Smit <i>et al</i> , 1999
EF4	GGAAGGGRTGTATTATTAG	

coli) DH5 感受态细胞, 蓝白斑筛选转化子, 挑选阳性克隆, 重新扩增插入片断, 将含有合适大小插入片段的克隆送上海美季生物技术有限公司进行测序。

1.5 序列分析

将序列提交到 RDP (ribosomal database project) 数据库, 利用在线工具 CHECK-CHIMERA 检测嵌合体; 应用 BLASTN 程序(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)搜索相似性序列, 进行系统发育分析。采用 ClustalX (Version 1.8)对序列进行比对分析, 通过 MEGA 5 软件构建系统发育树(Kumar *et al*, 2004), 采用 Neighbor-joining 建树方法, 建树结果进行 bootstrap1000 次系统检验; 利用 Phylip 软件包中 DNASIS 程序计算距离矩阵, 利用 DOTUR 计算 OTU(Schloss *et al*, 2005)。引物 ITS1/ITS4、EF3/EF4、NS1/NS4 扩增的部分序列在 GenBank 核苷酸数据库中的接受号分别为 KM067396—KM067409、KM067410—KM067425、KM067426—KM067449。

2 结果与分析

2.1 三对引物的真核微生物文库数据分析与对比

将测序返回的序列经拼接去载体后, 三对引物 ITS1/ITS4、EF3/EF4 和 NS1/NS4 分别获得 94、100 和 129 个有效克隆子。通过 DOTUR 软件将相似性大于 97%的克隆子归类为同一个 OTU, ITS1/ITS4 序列属于 35 个 OTU; EF3/EF4 序列属于 61 个 OTU; NS1/NS4 序列属于 80 个 OTU。三对引物克隆文库的多样性指数见表 2, 通过 DOTUR 软件制作稀释性曲线见图 1。

文库分析结果表明: ITS1/ITS4、EF3/EF4、NS1/NS4 三对引物克隆文库的 Chao 1 指数、ACE 丰富度指数和 Shannon-Weiner 指数依次递增, 而 Simpson 优势度指数则依次递减, 4 个指数都说明三个文库的多样性以 NS1/NS4 最高, EF3/EF4 其次, ITS1/ITS4 最后。从稀释性曲线上可以看出, 多样性由高到低排列依次为 NS1/NS4、EF3/EF4、ITS1/ITS4, 与多样性指数分析结果相一致; 随着克隆抽样次数

表 2 东海陆架表层沉积物真核微型生物多样性指数
Tab.2 The microeukaryotic diversity from the surface layer sediments of the East China Sea

克隆文库	克隆子数	可操作分类单元	Bias-corrected Chao 1	ACE 丰富度指数	香农指数(H')	直引辛普森指数(D)
ITS1/ITS4 library	94	35	99.5	110.901	3.30508	0.0423244
EF3/EF4 library	100	61	145.5	197.446	3.91262	0.0175758
NS1/NS4 library	129	80	291.111	320.706	4.13032	0.0152616

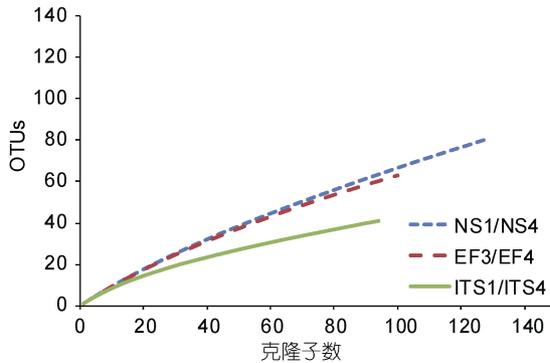


图 1 三个文库的稀释性曲线

Fig.1 Rarefaction curves of three clone librares

的增加, 稀释性曲线的斜率都有一定程度的变小, 三对引物克隆文库的 OTU 类型都有一定程度的饱和, 但 ITS1/ITS4 曲线相较于 NS1/NS4 和 EF3/EF, 明显趋于平坦, 说明用于 ITS1/ITS4 多样性分析的取样数量要明显少于其它两对引物, 相对较少的克隆子可以反映多数微型真核生物的物种信息。

2.2 三对引物的克隆文库 OTUs 物种类群总述

应用 BLASTN 搜索相似性序列, 显示东海陆架 DH13 站点 176 个 OTU 可分为 4 界 24 个类群, 如图 2 所示。其中原生生物界(Protist, 125 个 OTU)具有显著的优势种群地位(占 71%), 包含丝足虫门(Cercozoa, 64 个 OTU)、横裂甲藻纲(Dinophyceae, 25 个 OTU)、不等鞭毛门(Stramenopiles, 13 个 OTU)、纤毛虫门(Ciliophora, 11 个 OTU)、无根虫门(Apusozoa, 5 个 OTU)、顶复门(Apicomplexa, 3 个 OTU)、囊泡虫总门(Alveolata, 2 个 OTU)、隐藻门(Cryptophyta, 1 个 OTU)和眼虫门(Euglenozoa, 1 个 OTU)等 9 个类群。真菌界(Fungi)共有 35 个 OTU(占 19.9%), 包含子囊菌门(Ascomycota, 13 个 OTU)、壶菌门(Chytridiomycota, 11 个 OTU)、真菌类(Fungi environmental samples, 8 个 OTU)、毛霉亚门(Mucoromycotina, 2 个 OTU)和担子菌门(Basidiomycota, 1 个 OTU)等 5 个类群。动物界(Metazoa, 13 个 OTU, 占 7.4%)包含了环节动物门(Annelida, 4 个 OTU)、腕足动物门(Brachiopoda, 3 个 OTU)、扁形动物门(Platyhelminthes, 1 个 OTU)、线虫

动物门(Nematoda, 1 个 OTU)、软体动物门(Mollusca, 1 个 OTU)、轮形动物门(Rotifera, 1 个 OTU)和刺胞动物门(Cnidaria, 1 个 OTU)等 8 个类群。丰度最少的植物界(Plantae, 3 个 OTU, 占 1.7%)则是包含绿藻门(Chlorophyta, 1 个 OTU)和维管植物门(Tracheophyta, 1 个 OTU)2 个类群。

2.3 三对引物的克隆文库 OTUs 物种类群比较

将三对引物 ITS1/ITS4、EF3/EF4 和 NS1/NS4 所获得的克隆文库(OTU 分型)结果, 以“门”为基准, 比较三个文库 OTU 的物种多样性, 分类标准以 NCBI Taxonomy 上的分类为基础, 结果见图 3、图 4、图 5。

综合分析图 3、图 4、图 5 结果表明: 三对引物的克隆文库 OTUs 都至少包含了原生生物界(Protist)、真菌界(Fungi)、植物界(Plantae)三大界, 且原生生物界(Protist)占据了很大的比重, 均超过了 50%, 而特异的是 NS1/NS4 同时还有相当多类群的动物界(Metazoa)OTUs。

ITS1/ITS4 克隆文库分为 4 界 11 个类群(见图 3), 其中主要为原生生物界(57.1%)和真菌界(34.3%)。原生生物界涵盖了: 横裂甲藻纲(Dinophyceae, 9 个 OTU), 纤毛虫门(Ciliophora, 7 个 OTU), 无根虫门(Apusozoa, 1 个 OTU), 丝足虫门(Cercozoa, 1 个 OTU), 不等鞭毛门(Stramenopiles, 1 个 OTU)以及囊泡虫总门(1 个 OTU)。真菌界分为 3 类群, 子囊菌门(Ascomycota, 10 个 OTU)含量最高, 另有少量担子菌门(Basidiomycota, 1 个 OTU)和真菌类(Fungi, 2 个 OTU)。除此之外, 动物界的刺胞动物门(Cnidaria, 1 个 OTU)和植物界的绿藻门(Chlorophyta, 1 个 OTU)也有被检测到类似序列的存在。

EF3/EF4 克隆文库分为 3 界 6 个类群(见图 4), 同样以原生生物界(70.5%)和真菌界(27.9%)为主。原生生物界均为丝足虫门(Cercozoa, 43 个 OTU)。真菌界分为 4 个类群, 以壶菌门(Chytridiomycota, 7 个 OTU)和真菌类(Fungi, 5 个 OTU)为主, 另有子囊菌门(Ascomycota, 3 个 OTU)和毛霉亚门(Mucoromycotina, 2 个 OTU)。植物界则是唯一的维管植物门(Tracheophyta, 1 个 OTU)。

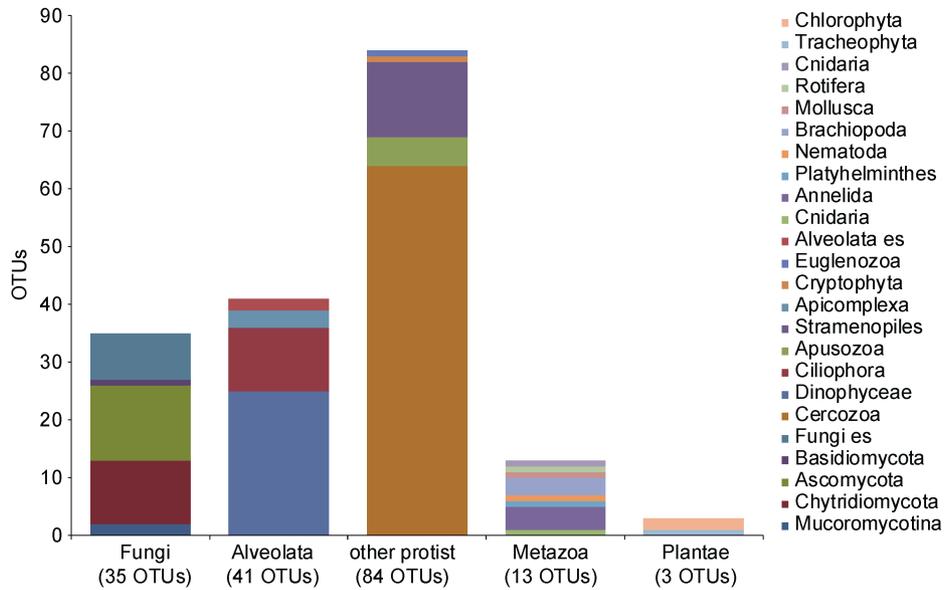


图 2 DH13 站点中 176 个 OTU 的物种分类示意图
Fig.2 Species classification for 176 OTUs from station DH-13

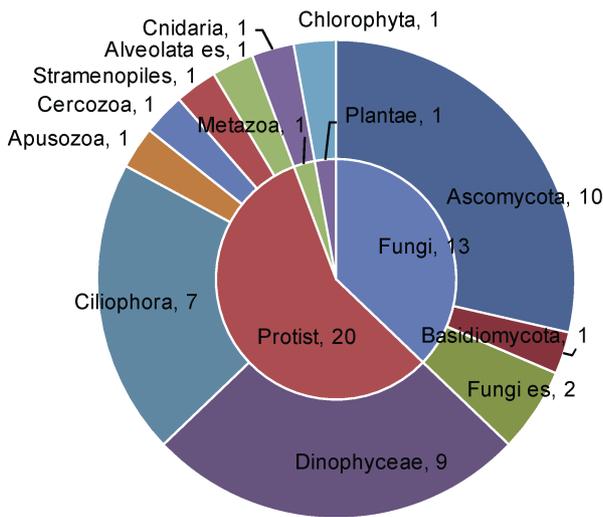


图 3 ITS1/ITS4 引物克隆文库的 OTU 类群比例
Fig.3 Ratio of OTU groups from clone library of primer pairs ITS1/ITS4
es: 环境样本(environmental samples)

NS1/NS4 克隆文库展现了最高的多样性, 共含 4 界 19 个类群(见图 5), 原生生物界(占 77.5%)仍是最主要的优势种群, 其中丝足虫门(Cercozoa, 20 个 OTU)、横裂甲藻纲(Dinophyceae, 16 个 OTU)和不等鞭毛门(Stramenopiles, 12 个 OTU)为主要的三个门, 此外还有眼虫门(Euglenozoa, 1 个 OTU)、隐藻门(Cryptophyta, 1 个 OTU)、无根虫门(Apusozoa, 4 个 OTU)、纤毛虫门(Ciliophora, 4 个 OTU)、顶复门(Apicomplexa, 3 个 OTU)以及囊泡虫总门(Alveolata

environmental samples, 1 个 OTU)。真菌界(占 6.25%)以壶菌门(Chytridiomycota, 4 个 OTU)为主。与其它两对引物克隆文库不同的是, NS1/NS4 中动物界(15%)占到了第二位, 且多样性较高, 具有 7 个类群: 环节动物门(Annelida, 4 个 OTU)、扁形动物门(Platyhelminthes, 1 个 OTU)、线虫动物门(Nematoda,

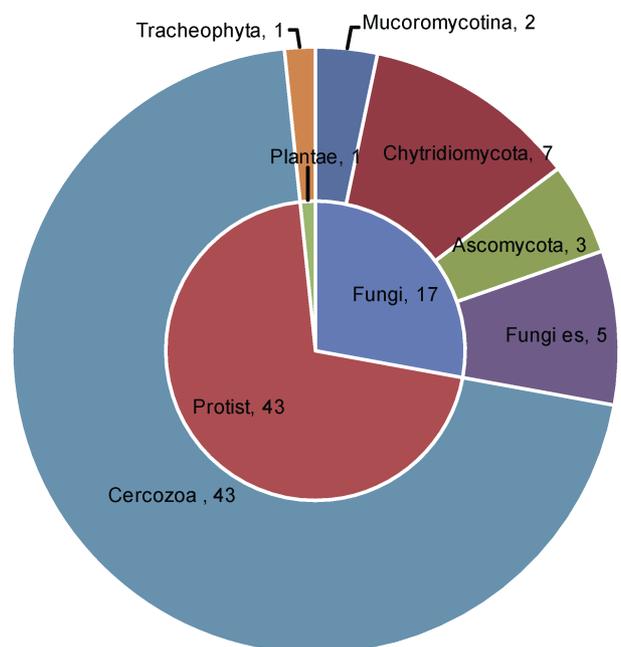


图 4 EF3/EF4 引物克隆文库的 OTU 类群比例
Fig.4 Ratio of OTU groups from clone library of primer pairs EF3/EF4
es: 环境样本(environmental samples)

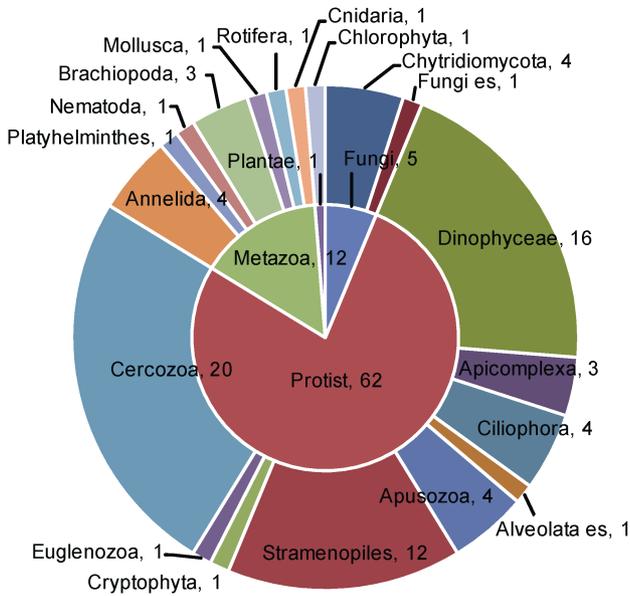


图 5 NS1/NS4 引物克隆文库 OTU 类群比例图

Fig.5 Ratio of OTU groups from clone library of primer pairs NS1/NS4

es: 环境样本(environmental samples)

1 个 OTU)、腕足动物门(Brachiopoda, 3 个 OTU)、软体动物门(Mollusca, 1 个 OTU)、轮形动物门(Rotifera, 1 个 OTU)和刺胞动物门(Cnidaria, 1 个 OTU)。植物界则以绿藻门(Chlorophyta, 1 个 OTU)为代表。

2.4 三对引物的克隆文库系统发育学分析

2.4.1 三对引物的真菌克隆文库系统发育分析
 分别从三对引物克隆文库中选取代表性 OTUs 构建真菌系统发育树, 结果见图 6、图 7、图 8 所示。

ITS1/ITS4 克隆文库构建的真菌系统发育树主要含子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)

2 个类群(图 6)。子囊菌门(Ascomycota)中的代表性基因型 DH132F36-A 与一株来自于云南水稻根性寄生的未培养克隆子 R3-6 有高同源性(99%), 基因型 DH132F27、DH132F14 与地毯草(*Axonopus compressus*)根圈中分离的未培养土壤真菌克隆子 FITS_HRP1_W16 具有高同源性(99%), 基因型 DH132F17-c 与用于分解芒草和甘蔗细胞壁的 *Phaeosphaeriopsis* sp. TMS-2011 有高同源性(99%), 基因型 DH134F09 与白黄笋顶孢霉(*Acrostalagmus luteoalbus* isolate L03)有高同源性(99%), 此类霉菌同样在深海环境中被发现, 并用于细胞毒素的研究(Wang *et al*, 2012)。担子菌门(Basidiomycota)中的代表性基因型 DH132F30-B 与夏威夷海域的银耳目(Tremellales) LM477 有较高同源性(95%)。

EF3/EF4 克隆文库构建的真菌系统发育树中主要类群为壶菌门(Chytridiomycota)和子囊菌门(Ascomycota)2 个类群(图 7)。壶菌门(Chytridiomycota)中的基因型 DH133F27 与法国湖泊 Pavin 和 Aydat 中的未培养壶菌 PA2009B6 有较高同源性(95%), 基因型 DH131F01-a 与红根囊壶菌(*Rhizophlyctis rosea* JEL 318)有 93%的同源性, 基因型 DH134F60、DH134F06、DH134F11 与喜马拉雅山脉、落基山脉的未培养壶菌克隆子有 90%的同源性, 先前的研究显示高海拔土壤真菌中壶菌占主导地位(Freeman *et al*, 2009)。子囊菌门(Ascomycota)中的基因型 DHE134-1 与海洋中的二尖梅奇酵母(*Metschnikowia bicuspidate*, DQ520881)有高同源性(99%), 该酵母被认为是三疣梭子蟹乳化病的致病菌(Wang *et al*, 2007)。此外基因型 DHE132-10 与一株未培养 Fungus clone nco32b11c1 有高同源性(99%)。

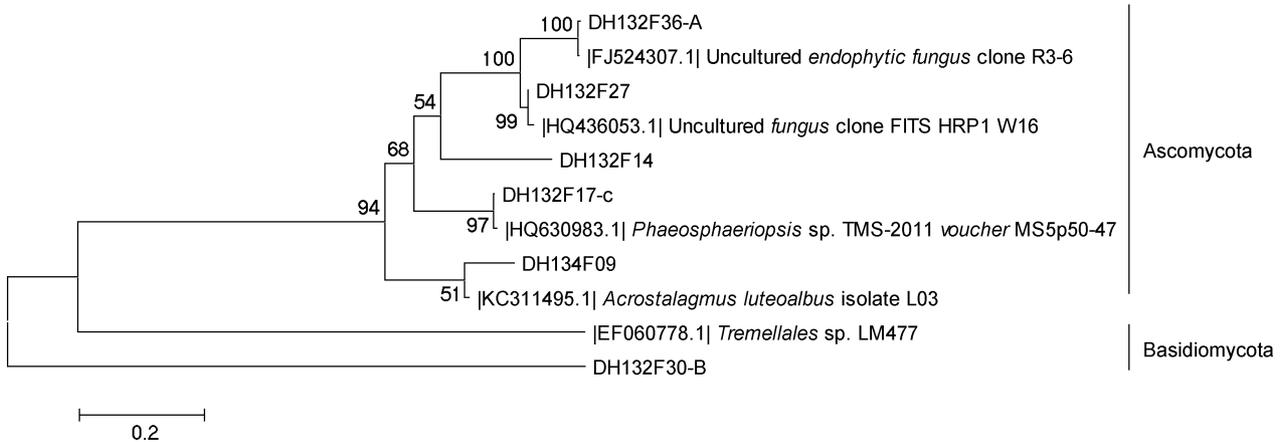


图 6 根据 ITS1/ITS4 克隆文库构建的真菌系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of Fungi according to clone library of primer pairs ITS1/ITS4

NS1/NS4 克隆文库构建的真菌系统发育树中基因型都为壶菌门(*Chytridiomycota*), 如图 8 所示。基因型 DH1331F43 与海洋藻类病原体菌株-壶菌 *polysiphoniae* 有 93% 的同源性, 基因型 DH1321F31 与 EF3/EF4 中的部分基因型(DH134F60, DH134F06, DH134F11)相同, 与喜马拉雅山脉、落基山脉的未培养壶菌克隆有较高同源性(94%)。

2.4.2 三对引物的原生生物克隆文库系统发育分析分别从三对引物克隆文库中选取代表性 OTUs 构建原生生物系统发育树, 结果见图 9、图 10、图 11 所示。

ITS1/ITS4 克隆文库构建的原生生物系统发育树主要分为囊泡虫总门(*Alveolata*)、不等鞭毛门(*Stramenopiles*)、无根虫门(*Apusozoa*)和丝足虫门(*Cercozoa*)四大类。而囊泡虫总门(*Alveolata*)中的纤毛虫门(*Ciliophora*)和双鞭毛虫门(*Dinoflagellata*)下的横裂甲藻纲(*Dinophyceae*), 两者占到了 ITS1/ITS4 克隆文库原生生物界的绝大多数(图 9)。纤毛虫门(*Ciliophora*)基因型 DH133-5 和海洋拟急游虫(*Strombidinopsis Sopsis99-1*)有着高相似性(98%), 基

因型 DH131-1 和急游虫属(*Strombidium* LLK-2005)有着较高相似性(94%), 而基因型 DH131-2 则与中国大陆海洋鱼类中分离到的刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)相似, 但相似度不高(85%)。横裂甲藻纲(*Dinophyceae*)基因型 DH134-12 与异帽藻(*Heterocapsa*)相似(89%), 基因型 DH133-31 与裸甲藻(*Gymnodinium beii*)高度相似(99%)。基因型 DH131-23 与 MAST-4 类群的未培养不等鞭毛门克隆子 M_IND70.7 有着较高相似性(94%), MAST-4 被认为是一个低进化多样性的类群(Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012)。无根虫门(*Apusozoa*)基因型 DH131-7 与海洋中分离的 *Apusomonas proboscidea* 相似, 但相似度不高(87%)。丝足虫门(*Cercozoa*)基因型 DH132F19 与海洋丝足虫类 *Thaumatomastix* 克隆子有着较高相似性(93%)。

EF3/EF4 克隆文库构建的原生生物系统发育树显示均为丝足虫门(*Cercozoa*), 这与 ITS1/ITS4 和 NS1/NS4 显示出的原生生物多样性显著不同, 如图 10 所示。基因型 DH131F02-a 与未培养丝足虫类 4-E2 相似(95%), DH131F03 与未培养丝足虫类 3b-F5 相似

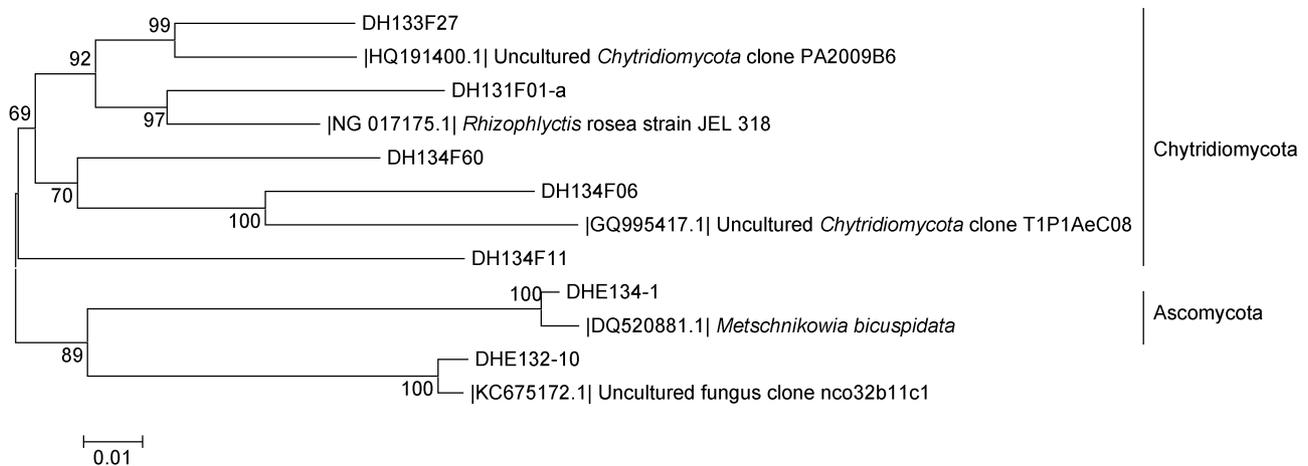


图 7 根据 EF3/EF4 克隆文库构建的真菌系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of Fungi according to clone library amplified with primer pairs EF3/EF4

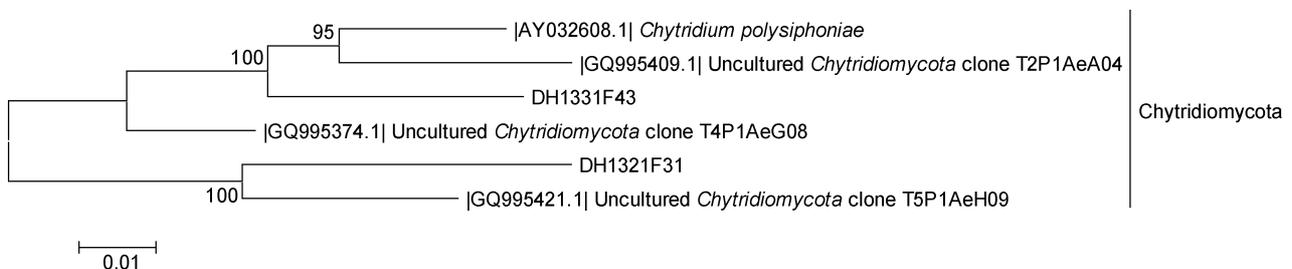


图 8 根据 NS1/NS4 克隆文库构建的真菌系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree of Fungi according to clone library amplified with primer pairs NS1/NS4

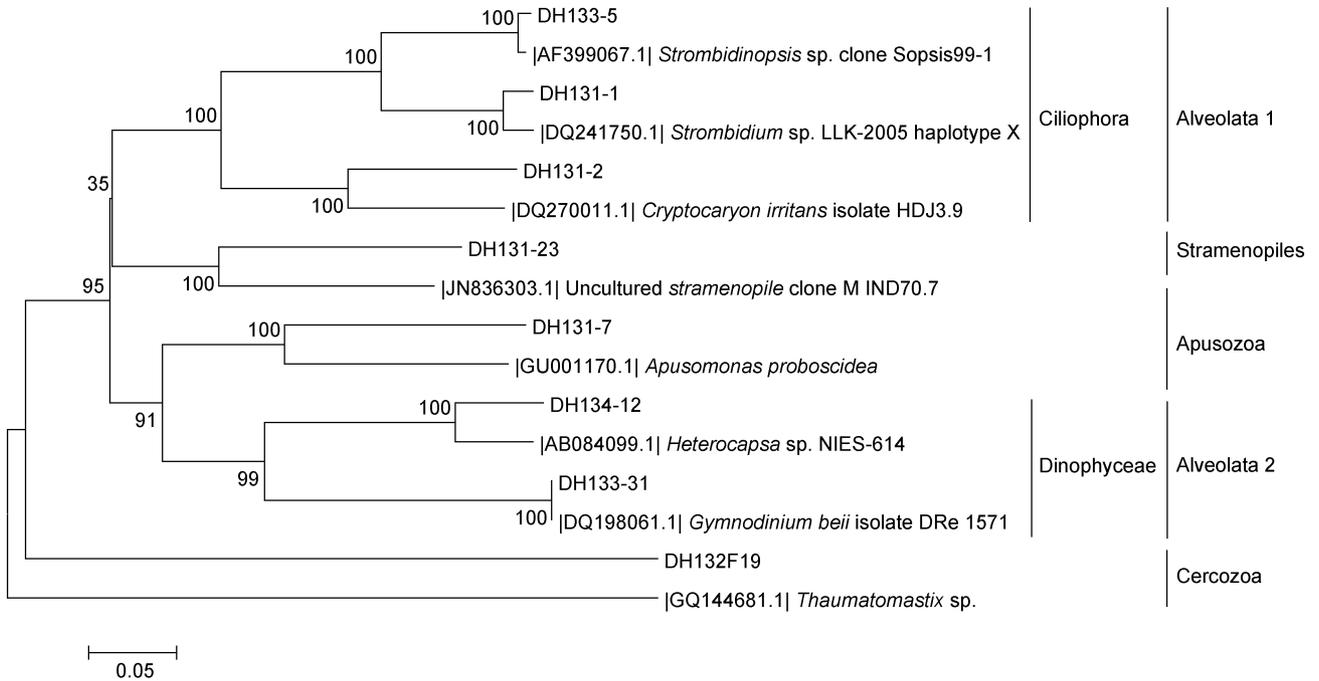


图 9 根据 ITS1/ITS4 克隆文库构建的原生生物系统发育树

Fig.9 Phylogenetic tree of Protist according to clone library amplified with primer pairs ITS1/ITS4

(95%), 两个相似序列均来自于波罗的海的海雪(sea snow)中。基因型 DH132F33-a 和 DH133F22 分别与来自加拿大不列颠哥伦比亚省海洋底栖生物栖息地中的丝足虫类 CC-2009c 和 CC-2009e 相似, 相似度为 96%和 94%。基因型 DH131F04-a 与广泛分布于国内

外沿海浮游生物群落中的吞噬鞭毛虫(*Ebria tripartite* isolate 2)有 94%的相似度。基因型 DH133F46 和基因型 DH132F15-a 分别与海洋丝足虫类的 *Cryothecomonas* APCC MC5-1Cryo 和 *Thaumatomastix* CC002 有较高相似度, 相似度为 97%和 96%。

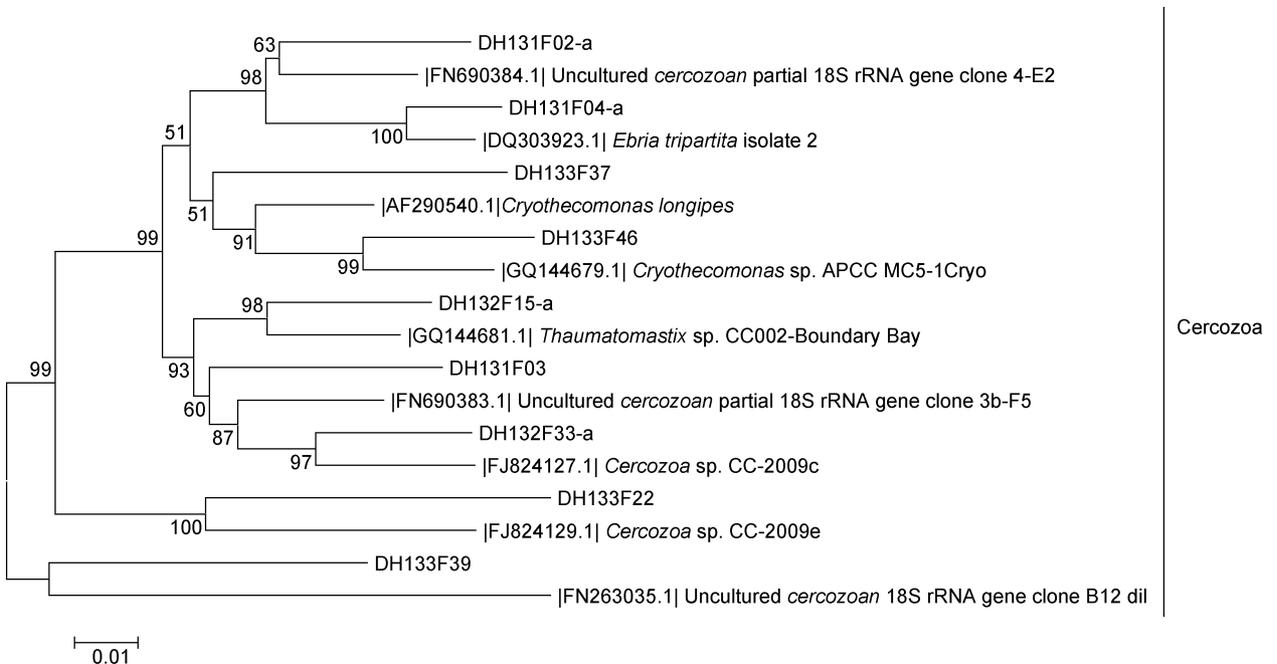


图 10 根据 EF3/EF4 克隆文库构建的原生生物系统发育树

Fig.10 Phylogenetic tree of Protist according to clone library amplified with primer pairs EF3/EF4

NS1/NS4 克隆文库表现出了丰富的原生生物多样性, 选取其中 4 个主要类群囊泡虫总门(Alveolata)、不等鞭毛门(Stramenopiles)、丝足虫总门(Cercozoa)和无根虫门(Apusozoa)的代表性 OTUs 构建系统发育树(图 11)。

囊泡虫总门(Alveolata)分为纤毛虫门(Ciliophora)和双鞭毛虫门(Dinoflagellata)下的横裂甲藻纲(Dinophyceae)两个类群, 与 ITS1/ITS4 相同, 纤毛虫门(Ciliophora)基因型 DH1311F40 与韩国西部海岸的 *Strombidinopsis jeokjo* SBNS0310HJ 有高度同源性(99%), 基因型 DH132F32 与黄海的 *Paradisoco-*

phalus elongatus 克隆子有高相似度(98%)。横裂甲藻纲(Dinophyceae)基因型 DH1331F18 与海洋环境中的 *Euduboscquella* 克隆子有较高相似度(95%), 基因型 DH1311F04 与 *Gonyaulax spinifera* 克隆子有较高相似度(95%), 基因型 DHY1 与 *Alexandrium satoanum* 克隆子有高同源性(99%), 基因型 DH1331F38 与贫氧海洋环境中的未培养双鞭毛虫 CCW105 有 90% 的相似度。基因型 DH132F81 与韩国西部海岸的 *Woloszynskia cincta* 克隆子有高同源性(99%), 基因型 DH1331F29 与 *Lepidodinium chlorophorum* 克隆子有较高相似度(96%), 基因型 DH1341F07 与异帽藻(*Heterocapsa*

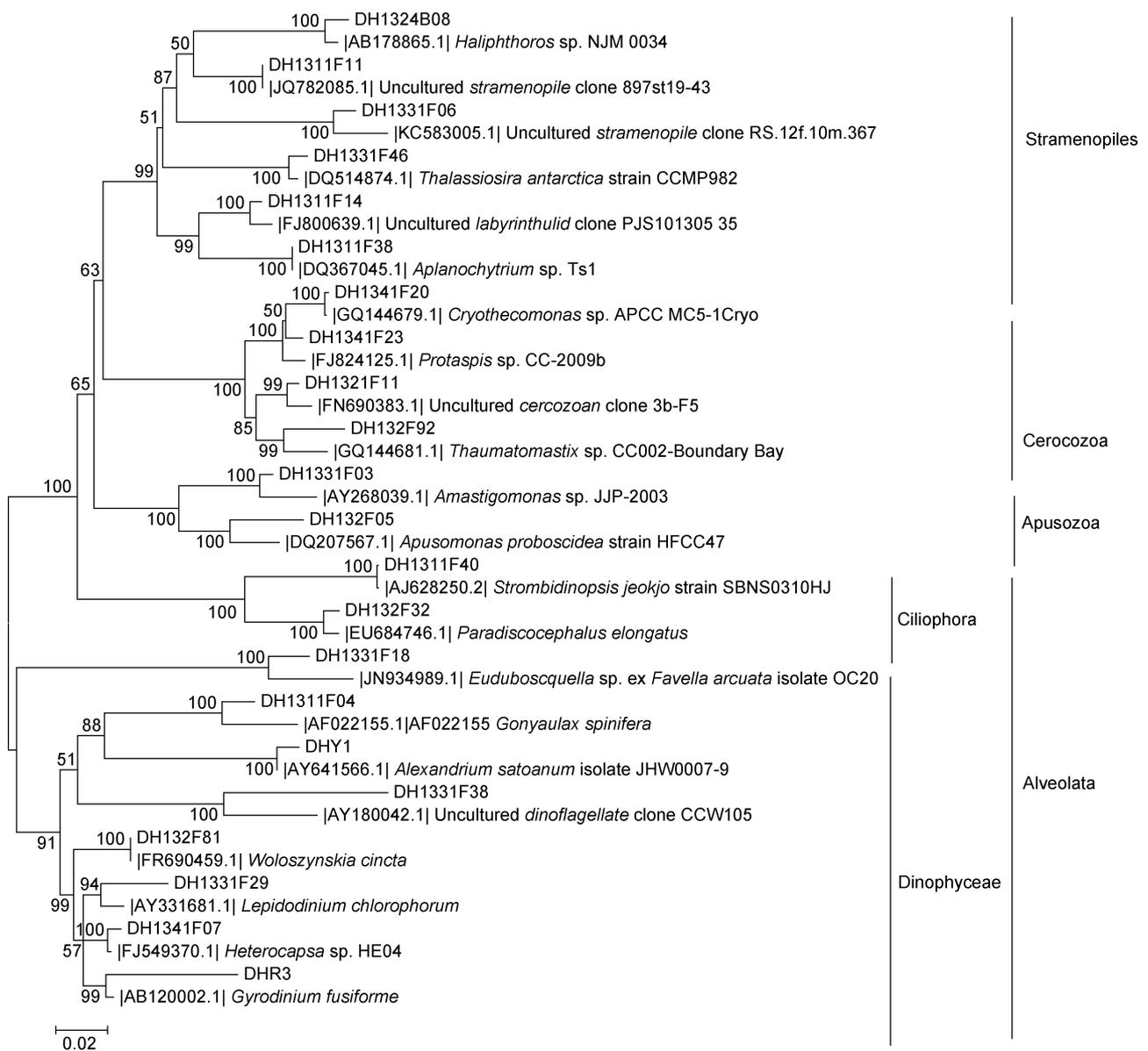


图 11 根据 NS1/NS4 克隆文库构建的原生生物系统发育树

Fig.11 Phylogenetic tree of Protist according to clone library amplified with primer pairs NS1/NS4

HE04)有高相似度(99%), 基因型 DHR3 与 *Gyrodinium fusiforme* 克隆子有较高相似度(94%)。

不等鞭毛门(Stramenopiles)有代表性基因型 OTU6 个, 其中基因型 DH1324B08 与一株为未识别的类似 *Haliphthoros* 克隆子 NJM 0034 相似度为 97%; 基因型 DH1311F11 与北太平洋海域的未培养不等鞭毛类 897st19-43 有高相似度(99%); 基因型 DH1331F06 与来自于红海东北海岸一个贫营养站点的未培养不等鞭毛类 RS.12f.10m.367 有较高相似度(95%), 该站点的海洋不等鞭毛门(Marine Stramenopiles)类群多样性丰富, 是第二大类群(OTUs 16.8%) (Acosta *et al.*, 2013); 基因型 1331F46 与南极洲海域的 *Thalassiosira* CCMP982 有高相似度(99%); 基因型 1311F14 与美国纽约长岛海域沉积物的一个未培养 *Labyrinthulid* PJS101305_35 有 98% 的相似度; 基因型 1311F38 与 *Aplanochytrium* Ts1 有高相似度(99%)。

丝足虫门(Cercozoa)与 EF3/EF4 非常相似, 基因型 DH1341F20 和基因型 DH132F92 分别与海洋丝足虫类的 *Cryothecomonas* APCC MC5-1Cryo 和 *Thaumatomastix* CC002 相似, 相似度为 99% 和 94%, 基因型 DH1341F23 的相似序列来自于加拿大不列颠哥伦比亚省海洋底栖生物栖息地中的丝足虫类克隆子, 相似度为 98%, 基因型 DH1321F11 与波罗的海海雪中的未培养丝足虫类 CC-2009b, 相似度为 98%。

无根虫门(Apusozoa)基因型 DH1331F03 与 *Amastigomonas* JJP-2003 有较高同源性(96%), 基因型 DH132F05 与 *Apusomonas proboscidea* HFCC47 有 91% 的相似度。

3 讨论

3.1 真核微型生物多样性研究中的引物选择

随着分子生物学的不断发展, 越来越多的引物被设计应用于真核微型生物分子生态学研究, 除了本文使用的三对引物外, Euk1A/Euk516r (鲍磊等, 2008)、nu-SSU-0817/nu-SSU-1196 or 1536 (Borneman *et al.*, 2000)、18S-42F or 82F/18S-1498R or 1520R (Takishita *et al.*, 2006)、Euk-A/Euk-B (Koid *et al.*, 2012) 等也同样被应用于真核微型生物的研究。

本文使用的三对引物最初被设计用于子囊菌、小麦根系等陆地真核微型生物多样性的研究(White *et al.*, 1990; Bernier *et al.*, 1994; Smit *et al.*, 1999), 后来也被用于海洋环境真核微型生物研究, 如 Lai 等(2007)应用 ITS1/ITS4 引物对南海深海甲烷水合沉积物中真

菌群落结构进行了初步研究, 扩增得到的大多数真菌可归类为 *Ascomycota* 和 *Basidiomycota*; Gao 等(2008)应用 ITS1/ITS4、EF3/EF4 等 8 对引物扩增夏威夷海绵共附生真菌; Nagano 等(2010)应用 ITS1/ITS4 引物扩增到了深海沉积物中新的真菌类群; 高远等(2012)应用 ITS1/ITS4 对鄂霍次克海冷泉沉积物真核微型生物多样性进行研究; Singh 等(2012)分别使用 NS1/NS4 和 ITS1/ITS4 对深海沉积物中可培养和不可培养两种形式的真菌进行了扩增。

但上述多数研究仅使用单一引物对环境真核微型生物进行分析, 研究者们也逐渐发现仅用单一引物来研究复杂环境样本中的真核微型生物多样性存在着倚倚和局限性, 如 Smit 等(1999)在分析了小麦根系样本后认为引物 EF3/EF4 略微偏向于扩增担子菌和接合菌。因此采用多种引物进行比较分析的相关研究在近些年也逐渐被研究人员关注(Anderson *et al.*, 2003), 但是对于海洋沉积环境的相关比较分析还未发现, 本文研究结果对更深入地开展海洋沉积环境真核微型生物多样性的研究有着借鉴作用。

3.2 不同引物的扩增特异性及其多样性

本文三对引物扩增得到的克隆文库均包含了沉积物中真核微型生物的主要类群: 原生生物(Protist)和真菌(Fungi), NS1/NS4 克隆文库还独特的扩增到了一些动物界(Metazoa)类群。

原生生物类群在三对引物中比例都达到了 50% 以上, ITS1/ITS4 克隆文库与 NS1/NS4 克隆文库均包含了横裂甲藻纲(Dinophyceae)、纤毛虫门(Ciliophora)、丝足虫门(Cercozoa)、无根虫门(Apusozoa)和不等鞭毛门(Stramenopiles)5 个类群, 且横裂甲藻纲(Dinophyceae)在两个文库中均为优势类群(45% 和 25.8%), 此外 NS1/NS4 扩增到了独有的 3 个类群(Apicomplexa, Cryptophyta, Euglenozoa), 在三对引物对原生动物的扩增中展现了最高的多样性。但 EF3/EF4 克隆文库中所有原生生物克隆子均为丝足虫门(Cercozoa), 这可能是由于 EF3/EF4 引物对海洋沉积物中原生生物类群扩增具有局限性。

真菌方面, 三对引物扩增结果各异。ITS1/ITS4 克隆文库主要是子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota); EF3/EF4 克隆文库是子囊菌门(Ascomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和毛霉亚门(Mucoromycotina); NS1/NS4 克隆文库则基本都是壶菌门(Chytridiomycota)。这些类群与国际上沉积物真菌多样性研究中的主要类群基本一致(Lai *et al.*, 2007;

Nagano *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012)。值得注意的是, Smit 等(1999)认为 EF3/EF4 引物在培养生物和环境样本的扩增中轻微偏向于扩增担子菌门(Basidiomycota)和接合菌门(Zygomycota), 但这两个类群在东海陆架表层沉积物中都被扩增到, 这可能是由于小麦根系与海洋沉积物的环境差异性所导致的, 而 Burgaud 等(2013)应用 EF3/EF4 引物对美国特拉华河口沉积物的扩增所得主要类群为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和壶菌门(Chytridiomycota), 与本文结果类似。

3.3 引物选择对海洋原生生物多样性研究的影响

虽然三对引物在国际上的研究中多被用于真菌多样性的研究, 但根据本文的数据结果显示, 三对引物都扩增到了较多的原生生物类群, 尤其是 NS1/NS4 引物, 原生生物类群的多样性在三对引物中是最高的。Park 等(2008)应用引物 18S-82F/18S-1520R 扩增东海表层沉积物的研究中显示, 90%的克隆序列为原生生物, 主要类群为纤毛虫门(Ciliophora, 18%)、双鞭毛虫门(Dinoflagellata, 19%)、不等鞭毛门(Stramenopiles, 11%)和丝足虫门(Cercozoa, 20%), 与本文三对引物扩增结果基本一致, 且除领鞭毛虫门(Choanozoa)外, Park 等(2008)文中所扩增得到的原生生物类群本文同样扩增得到。因此本文推断, ITS1/ITS4、NS1/NS4 引物同样可应用于海洋沉积物原生生物多样性的研究中, 作为其进一步的补充和延伸, 而 EF3/EF4 则由于其在丝足虫门(Cercozoa)扩增上的相对专一性, 可能更适用于丝足虫门(Cercozoa)下不同种属多样性的研究。

4 结论

本文选择三对真核微生物的通用引物(NS1/NS4, EF3/EF4, ITS1/ITS4), 通过 18S rDNA、ITS 区的基因克隆和文库构建, 对东海陆架 DH-13 站点沉积物真核微生物类群进行分类学、多样性和系统发育分析, 研究发现三对引物的选择不同对真核微生物多样性的影响较显著, 尤其是在原生生物的扩增上。本文的研究结果再次说明了对特异性 PCR 引物进行严格检测以适用于目的类群扩增的重要性和迫切性, 同时也说明了单一引物扩增的局限性, 通过多种引物综合使用来评估复杂环境中真核微生物多样性是必要的, 未来的研究和分析应更侧重于综合性的处理方法。

参 考 文 献

王健鑫, 许贤恩, 周链链等, 2012. 东海陆架表层沉积物微生

- 物多样性初步研究. 海洋与湖沼, 43(4): 806—813
- 李家彪, 2008. 东海区域地质. 北京: 海洋出版社, 1—105
- 汪 岷, 江雪娇, 2009. 海洋微小型真核生物分子多样性的研究方法. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 39(4): 627—632
- 宋志刚, 许强芝, 鲁心安等, 2006. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究. 微生物学通报, 33(1): 63—67
- 张林宝, 李铁刚, 党宏月等, 2010. 东海内陆架泥质区沉积物古菌群垂直向分布特征. 地球科学——中国地质大学学报, 35(2): 255—260
- 高 远, 李富超, 姜 鹏等, 2012. 鄂霍次克海冷泉沉积物真核生物多样性的初步研究. 海洋科学, 36(5): 29
- 鲍 磊, 陈纪新, 黄邦钦等, 2008. 应用变性梯度凝胶电泳研究厦门西海域超微型真核浮游生物多样性. 海洋环境科学, 26(6): 504—509
- 戴 欣, 蔡创华, 2001. 海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨. 中山大学学报: 自然科学版, 40(6): 51—54
- Acosta F, Ngugi D K, Stingl U, 2013. Diversity of picoeukaryotes at an oligotrophic site off the Northeastern Red Sea Coast. Aquatic Biosystems, 9(1): 16
- Anderson I C, Campbell C D, Prosser J I, 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environmental Microbiology, 5(1): 36—47
- Bernier L, Hamelin R C, Ouellette G B, 1994. Comparison of ribosomal DNA length and restriction site polymorphisms in Gremmeniella and Ascocalyx isolates. Applied and Environmental Microbiology, 60(4): 1279—1286
- Borneman J, Hartin R J, 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 66(10): 4356—4360
- Burgaud G, Woehlke S, Rédou V *et al.*, 2013. Deciphering the presence and activity of fungal communities in marine sediments using a model estuarine system. Aquatic Microbial Ecology, 70: 45—62
- Freeman K R, Martin A P, Karki D *et al.*, 2009. Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(43): 18315—18320
- Gao Z, Li B, Zheng C *et al.*, 2008. Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. Applied and Environmental Microbiology, 74(19): 6091—6101
- Köster M, Wardenga R, Blume M, 2008. Microscale investigations of microbial communities in coastal surficial sediments. Marine Ecology, 29(1): 89—105
- Koid A, Nelson W C, Mraz A *et al.*, 2012. Comparative analysis of eukaryotic marine microbial assemblages from 18S rRNA gene and gene transcript clone libraries by using different methods of extraction. Applied and Environmental Microbiology, 78(11): 3958—3965
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5: 150—163
- Lai X, Cao L, Tan H *et al.*, 2007. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. The ISME Journal, 1(8): 756—762
- Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y *et al.*, 2010. Fungal diversity in

- deep-sea sediments—the presence of novel fungal groups. *Fungal Ecology*, 3(4): 316—325
- Park S J, Park B J, Pham V H *et al*, 2008. Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea. *The Journal of Microbiology*, 46(3): 244—249
- Rodríguez F, Derelle E, Guillou L *et al*, 2005. Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environmental Microbiology*, 7: 853—859
- Rodríguez-Martínez R, Rocap G, Logares R *et al*, 2012. Low evolutionary diversification in a widespread and abundant uncultured protist (MAST-4). *Molecular Biology and Evolution*, 29(5): 1393—1406
- Schloss P D, Handelsman J, 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1501—1506
- Singh P, Raghukumar C, Meena R M *et al*, 2012. Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology*, 5(5): 543—553
- Smit E, Leeftang P, Glandorf B *et al*, 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2614—2621
- Takishita K, Tsuchiya M, Reimer J D *et al*, 2006. Molecular evidence demonstrating the basidiomycetous fungus *Cryptococcus curvatus* is the dominant microbial eukaryote in sediment at the Kuroshima Knoll methane seep. *Extremophiles*, 10(2): 165—169
- Wang F Z, Huang Z, Shi X F *et al*, 2012. Cytotoxic indole diketopiperazines from the deep sea-derived fungus *Acrostalagmus luteoalbus* SCSIO F457. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(23): 7265—7267
- Wang X, Chi Z, Yue L *et al*, 2007. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiological Research*, 162(1): 77—85
- White T J, Bruns T, Lee S *et al*, 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, 18: 315—322
- Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J, 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 6578—6583
- Zeng Y H, Li H Y, Jiao N Z, 2007. Phylogenetic diversity of planktonic archaea in the estuarine region of East China Sea. *Microbiological Research*, 162: 26—36

EFFECTS OF AMPLIFICATION WITH DIFFERENT PRIMERS ON MICROEUKARYOTIC DIVERSITY IN THE SURFACE LAYER SEDIMENTS OF THE EAST CHINA SEA

YU Kai-Cheng¹, WANG Jian-Xin¹, TAO Shi¹, LIU Ming-Hua¹,
JIANG Ran¹, LIU Xue-Zhu¹, HUANG Bei²

(1. Zhejiang Ocean University, Laboratory for Marine Microbial Molecular Ecology and Application, Zhoushan 316022, China;
2. Zhoushan Marine Ecological and Environmental Monitoring Station in Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China)

Abstract Three pairs of universal primer (ITS1/ITS4, EF3/EF4 and NS1/NS4) were applied to determine the amplification specificity and diversity difference in microeukaryotes isolated from surface sediment at station DH-13, on the East China Sea shelf. After the OTU classification and diversity analysis on 323 valid clones, we demonstrate that the library generated by the amplification of primer NS1/NS4 obtains the highest diversity, followed by the EF3/EF4, and then the ITS1/ITS4. Through comparison with NCBI and taxonomical study, we found that the dominant species mainly belong to the Protista, which includes Cercozoa (accounting for 36.4% of the total OTU), Dinophyceae (14.2%), Stramenopiles (7.4%) and Ciliophora (6.3%); meanwhile, a part of the species belongs to Fungi, such as Ascomycota (7.4%) and Chytridiomycota (6.3%). When it comes to the Protista, primer NS1/NS4 demonstrates the highest diversity, and it fits for the amplification about species of Cercozoa, Dinophyceae and Stramenopiles. Moreover, exclusive species was also amplified, such as Euglenozoa, Cryptophyta and Apicomplexa. In the course of amplification ITS1/ITS4 fits for the species of Dinophyceae and Ciliophora, while EF3/EF4 is suitable for Cercozoa. In terms of fungus, ITS1/ITS4 fits for the species of Ascomycota; EF3/EF4 fits for the species of Ascomycota and Chytridiomycota, while NS1/NS4 merely fits for the genus Chytridiomycota. The result of phylogenetic analysis reveals that most of the similar sequences in the phylogenetic tree of Protista amplified by the three pairs of primer were derived from marine environmental samples, whereas the fungal sequences were derived from both of the soil and ocean, suggesting that three pairs of the primer are fit for the molecular ecological analysis of Protista in marine sedimentary environment.

Key words microeukaryote; diversity; primer; 18S rDNA; ITS