

转基因鱼试验湖浮游生物群落 DNA 多态性与物种组成关系^{*1}

李学梅^{1,2}, 余育和^{1**}, 冯伟松¹, 颜庆云^{1,2}, 吴利^{1,2}, 张翔^{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 100049)

摘要: 采用 RAPD 和 PCR-DGGE 指纹技术对转基因鱼试验湖的浮游生物群落 DNA 多态性进行了研究, 并探讨了 DNA 多态性与物种组成的关系。结果显示: (1)形态学分类共鉴定到 44 种/类浮游生物: 其中藻类 13 种, 原生动 11 种, 轮虫 16 种, 枝角类和桡足类各 2 种。多甲藻(*Peridinium* sp.)、球形砂壳虫(*Difflugia globulosa*)、螺形龟甲轮虫(*Keratella cochlearis*)和针簇多肢轮虫(*Polyarthra trigla*)4 个物种在各个站丰度相对较高。(2) RAPD 扩增共获得 128 条长度在 200–1200bp 的谱带, 多态率为 61.7%, 特异性谱带占总谱带的 19.5%。(3)PCR-DGGE 指纹分析共获得 87 条扩增谱带, 其中原核生物谱带相对较多(50 条), 真核生物谱带较少(37 条), 多态率分别为 86%和 64.9%。尽管形态学鉴定和 DNA 指纹分析都表现出较高物种多样性, 但其相似性聚类却有差别: 物种组成聚类中 B、C 站聚为一类, D、E 站聚为一类, A 站独为一类; 两种 DNA 指纹分析聚类结果显示 C、D、E 三站聚为一类, A、B 聚为一类。综上所述, 在对浮游生物群落的研究中, 形态学方法与 DNA 指纹技术不显著对应, 后者能揭示更丰富的物种多样性, 但毫无疑问三种方法可以从不同方面表征群落结构。这将为进一步研究湖泊浮游生物群落结构和功能关系奠定坚实的基础。

关键词: DNA 多态性; RAPD; PCR-DGGE; 浮游生物群落; 转基因鱼试验湖

DNA polymorphism and species composition of plankton in an artificial lake for breeding transgenic fish

LI Xuemei^{1,2}, YU Yuhe¹, FENG Weisong¹, YAN Qingyun^{1,2}, WU Li^{1,2} & ZHANG Xiang^{1,2}

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

(2: *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China*)

Abstract: The present study was designed to explore relationship between DNA polymorphism, as revealed by RAPD and PCR-DGGE fingerprintings, and species composition of plankton community in an artificial lake for breeding transgenic fish. Planktonic samples were collected from five sampling sites in the artificial lake, and their similarity was assessed with cluster analysis. The results were: (1) a total of 44 planktonic taxa were identified, among which there were 13 algae, 11 protozoa, 16 rotifer, 2 Cladocera and Copepoda, respectively; (2) 128 observable bands were totally amplified by the 9 random primers screened in RAPD analysis, among which 61.7% and 19.5% were polymorphic bands and specific bands, respectively; (3) there were 87 distinct bands identified by the method of PCR-DGGE, among which 50 were 16S rRNA bands and 37 were 18S rRNA bands. Despite the analysis of morphological identification and DNA fingerprintings had shown a higher species diversity, the cluster of similarity was different: based on species composition, group 1 consisted of B, C sites, group 2 contained D, E sites, and group 3 only comprised of A site. However, according to the DNA fingerprint analysis, the plankton community of C, D, E were similar, and another two sites-A and B were similar. In summary, our results suggested that the species composition was not closely related to the DNA polymorphism of plankton community, and the latter can describe more species. However, the characteristics of biodiversity revealed from different

* 国家 973 项目(2007CB109205)和国家自然科学基金项目(30770298)联合资助。2008-07-29 收稿; 2008-09-11 收修改稿。

李学梅, 女, 1985 年生, 硕士研究生; E-mail: lanqian1985@163.com.

** 通讯作者; E-mail: yhyu@ihb.ac.cn.

aspects will provide basic data for elucidating the structure and function of plankton community in the ecosystem.

Keywords: DNA polymorphism; RAPD; PCR-DGGE; plankton community; artificial lake for transgenic fish

浮游生物是悬浮于水环境中的一类微小生物, 包括了解者(细菌)、生产者和消费者三个基本类群; 因其数量大、分布广、种类组成复杂, 故成为水体生物多样性的重要组成部分. 此外, 浮游生物是河流、湖泊、海洋等水体生态系统中食物链及生物生产力的基本环节, 具有承上启下的作用, 因此在生态学研究 中扮演重要的角色^[1-4].

目前, 对水体生态系统中浮游生物的研究大都基于物种形态学鉴定^[5-6]. 然而传统形态学鉴定方法对浮游生物群落的研究有一定局限性: (1)水环境中的浮游细菌等微生物, 仅有 1%可通过传统方法在培养皿上进行培养和分离, 尚有 85%–99%细菌种群不能被分离和鉴定^[7]; (2)一些不可克服的因素, 使物种鉴定不可能在样本采集后迅速实施, 因而一些物种会因其间物理化学条件变化而变形甚或死亡; (3)浮游生物所涉门类繁多、物种非常丰富, 对实体的研究受制于知识、经验及精力, 故只能对部分物种进行分类鉴定. 针对以上问题衍生出研究物种多样性的新方法——DNA 指纹技术, 常用 DNA 指纹技术主要有随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)和变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE). 前者操作简单, 可供选择的引物多且不需预知模板 DNA 的序列信息, 给遗传多样性的研究带来了很大的方便; 后者可靠性强、重现性好、方便快捷, 自 1993 年首次被 Muzyer 等^[8]应用于微生物生态学研究以来, 已经被广泛的应用各种环境微生物的多样性研究中. 2004 年余育和等^[9]探讨了 DNA 指纹技术在浮游生物群落级生命系统应用的可能性, 之后颜庆云等^[10-11]应用 DNA 指纹技术探讨了洞庭湖、长江流域等水体中浮游生物群落 DNA 指纹拓扑结构与物种多样性的对应关系, 取得有意义结果; 此外, 应用 DNA 指纹技术还进行了群落结构和理化因子关系的研究^[12-14].

本文以多福农庄转基因鱼试验湖为研究对象, 该湖是中国科学院水生生物研究所于 2001 年在湖北省梁子湖畔构建的人工模拟试验湖, 主要用于研究转基因鱼生态安全性. 本研究采用传统的形态学分类法以及 RAPD 和 PCR-DGGE 两种 DNA 指纹技术探讨转基因鱼试验湖浮游生物群落物种多样性, 揭示 DNA 多态性与物种组成之间的关系, 以为研究转基因鱼对饵料生物的影响及其生态安全评价创建技术方法.

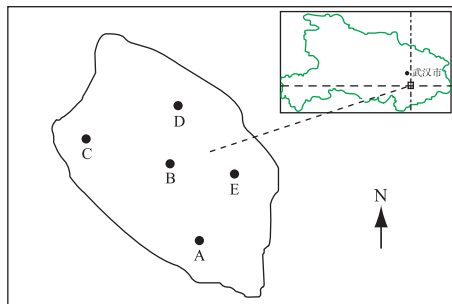


图 1 转基因鱼试验湖采样点分布
Fig.1 Distribution of the sampling sites in artificial lake for breeding transgenic fish

1 材料和方法

1.1 样品的采集

多福转基因鱼试验湖以梁子湖生物多样性为背景资料, 经放养不同功能类群的物种后构建的一个半自然水体生态系统, 平均水深 2m, 水面面积 $6.67 \times 10^4 \text{m}^2$, 依据水深及水生植被的不同设置了 A、B、C、D、E 5 个站(图 1). 本研究样本采集于 2007 年 7 月. 浮游生物定性样品用 25 μm 浮游生物网于水面下 0.5m 处捞取, 经甲醛溶液(4%)固定后进行物种鉴定; DNA 多态性分析样品(表层、底层水各 0.5L 混匀)装入白色塑料瓶中, 用于群落总 DNA 的抽提.

1.2 种类鉴定

浮游生物物种鉴定在 Zeiss Axioplan 2 imaging 显微镜

下进行(200 \times).

1.3 群落总 DNA 抽提

取 500ml 水样充分混合后经 GF/C 滤膜(孔径 1.2 μm)过滤, 并将滤膜在无菌条件下剪碎. 加入 3ml 裂解液(30 μl 蛋白酶 K, 30 μl Tris-Cl, pH=8.0, 150 μl SDS, 600 μl EDTA 和 2190 μl 双蒸水), 于 55 $^\circ\text{C}$ 水浴裂解 12h; 待其恢复室温后, 离心取上清液后用酚:酚:氯仿(1:1:1)和氯仿三次抽提; 用 2 倍体积的无水乙醇和 0.1 体积的 NaCl(3mol/L)沉淀 3h, 再以 70%的乙醇清洗、干燥后溶于 50 μl TE 溶液, 保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 备用. 总 DNA

用 0.7% 的琼脂糖凝胶(含 EB)进行电泳以评估制备效果,并用 BECKMANDU 530DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 含量和纯度.

1.4 RAPD 指纹分析

以 A 站浮游生物群落总 DNA 为模板,并用灭菌双蒸水作阴性对照,从 40 条随机引物中筛选出扩增结果稳定、谱带清晰且多态性好的 9 条引物: OPM-1、OPM-3、OPM-10、OPM-12、OPM-13、OPG-8、OPG-10、OPG-17、OPG-19. RAPD 反应参照 Williams 等^[15],并以正交法($L_9(3^4)$ 型)对反应体系中重要因素——DNA、dNTP、 $MgCl_2$ 及引物的含量进行优化,最终确定的反应体系为: 25.0 μ l 体系中包含约 50ng DNA(各模板基本一致), 2.5 μ l 10 \times PCR buffer, 2.0 μ l 25mM $MgCl_2$, 3.0 μ l 2mM dNTPs, 1.0ng 引物, 1.5U Taq 酶,其余的用灭菌双蒸水补齐. 经优化后的 PCR 循环参数如下: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5min, 后接 40 个循环,每个循环依次为 94 $^{\circ}C$ 变性 40s, 36 $^{\circ}C$ 退火 40s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2min, 最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 5min 终止于 4 $^{\circ}C$. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测、UVP 凝胶成像系统拍照,各 RAPD 扩增重复 2 次以上.

1.5 PCR-DGGE 指纹分析

以总 DNA 为模板分别对原核生物的 16S rRNA 基因和真核生物的 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增. (1) 扩增引物. 16S rRNA 基因扩增: F357GC: 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG-3', R518: 5'-ATTACCGCGCTGCTGG-3'^[18]. 18S rRNA 基因扩增: F1427GC: 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCCCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG-3', R1616: 5'-GCGGTGTGTACAA AGGGCAGGG-3'^[16].

(2) PCR 反应体系. 50 μ l PCR 反应体系组成如下: 10 \times PCR buffer 5 μ l, 25mM $MgCl_2$ 溶液 4 μ l, dNTPs 1.4 μ l, 正反向引物 20pmol, Taq 酶 3U, 模板 DNA 约 40 ng, 最后加灭菌双蒸水补齐至 50 μ l.

(3) PCR 反应条件. 采用 Touchdown PCR 模式进行, 16S rDNA 扩增参数为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5min; 然后 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 65–55 $^{\circ}C$ 退火 30s(每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}C$, 共计 10 个循环), 72 $^{\circ}C$ 延伸 1min; 接下来的 22 个循环的参数为 94 $^{\circ}C$ 变性 30s, 55 $^{\circ}C$ 退火 30s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1min, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min 终止于 4 $^{\circ}C$. 18S rDNA 扩增参数同 16S rDNA 相似略有改变: 递降温度范围为 68–58 $^{\circ}C$, 之后于 58 $^{\circ}C$ 进行 19 个循环. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并以此来决定 PCR-DGGE 的上样量.

(4) PCR-DGGE. PCR-DGGE 在 INGENYphor-U-2 系统中进行, 所用胶为浓度 9% (w/v) 的聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1), 电泳在 1 \times TAE 缓冲液中进行. 电泳时, 具有相同分子量的 PCR 产物会因变性剂甲酰胺和尿素的存在具有不同的解链行为, 从而得以分离. 变性剂梯度范围为 35%–50%, 以 60mA 的恒定电流在 60 $^{\circ}C$ 电泳 10h. 电泳结束后, 凝胶用 1 \times SYBR Gold 染色 30min, 最后用 1 \times TAE 缓冲液漂洗一次. 在 UVP 成像系统(UVP Inc. CA, USA)中观察电泳结果并拍照.

1.6 数据分析

RAPD 和 PCR-DGGE 图谱用凝胶分析软件(Quantity One 4.2. 3, Bio-Rad)进行分析. 各站谱带关系以 1/0 矩阵(1 代表有, 0 代表无)输出, 之后用 XLSTAT-Pro 软件建立相似性聚类图. 物种鉴定的结果同样转化为 1/0 矩阵, 导入 XLSTAT-Pro 软件中进行聚类.

2 结果

2.1 物种鉴定结果

5 个站共鉴定到 44 种/类浮游生物, 其中, 藻类 13 种, 原生动物 11 种, 轮虫 16 种, 枝角类 2 种, 桡足类 2 种. A 站出现的物种数最多(33), C 站物种数最少(18). 在所鉴定种类中, 31.8% 为所有站的共有种, 38.6% 为某一站特有种. 多甲藻(*Peridinium* sp.)、球形砂壳虫(*Diffugia globulosa*)、螺形龟甲轮虫(*Keratella cochlearis*)和针簇多肢轮虫(*Polyarthra trigla*)在各个站点出现频率较高(表 1).

2.2 RAPD 指纹分析

9 条随机引物共获得 128 条长度在 200–1200bp 的谱带, 多态率为 61.7%; 特异性谱带 25 条, 占总谱带的 19.5%. 各站的平均谱带为 87, 其中 E 站谱带最多, 为 93 条; D 站最少, 为 82 条(表 2).

表 1 浮游生物的物种组成(1 代表有, 0 代表无)

Tab.1 The species composition of plankton community (1 stands for presence, 0 stands for absence)

物种	A	B	C	D	E
藻类 Algae					
角甲藻 <i>Ceratium</i> sp.	1	1	0	1	1
多甲藻 <i>Peridinium</i> sp.	1	1	1	1	1
裸藻 <i>Euglena</i> sp.	1	1	1	1	1
分歧锥囊藻 <i>Dinobryon divergens</i>	1	1	1	1	1
空球藻 <i>Euglena</i> sp.	0	0	0	0	1
光明裸藻 <i>Euglena oxyuris</i>	1	0	0	0	0
尾棘囊裸藻 <i>Trachelomonas armata</i>	1	0	1	0	1
鱼鳞藻 <i>Mallomonas</i> sp.	1	0	0	0	0
梨形扁裸藻 <i>Phacus pyrum</i>	1	1	1	1	1
长尾扁裸藻 <i>Phacus longicauda</i>	1	0	0	0	0
囊裸藻 <i>Trachelomonas</i> sp.	1	1	1	1	1
杂球藻 <i>Pleodorina californica</i>	1	1	1	1	1
鳞孔藻 <i>Lepocinclis</i> sp.	0	1	1	1	0
原生动物 Protozoa					
冠状弯凸表壳虫 <i>Arcella gibbosa mitriformis</i>	1	0	0	0	0
纤毛虫 <i>Vorticella</i> sp.1	0	0	0	0	1
钟虫 <i>Vorticella</i> sp.2	0	0	0	0	1
球形砂壳虫 <i>Diffugia globulosa</i>	1	1	1	1	1
针棘匣壳虫 <i>Centropyxis aculeata</i>	0	0	0	1	1
长圆砂壳虫 <i>Diffugia oblonga</i>	1	0	0	0	0
绿眼虫 <i>Euglena viridis</i>	1	1	1	0	1
有棘鳞壳虫 <i>Euglypha acanthophora</i>	1	0	0	0	0
王氏似铃壳虫 <i>Tintinnopsis wangi</i>	1	1	0	1	1
三足虫 <i>Trinema</i> sp.	0	0	0	1	0
半眉虫 <i>Hemiophrys</i> sp.	0	0	0	1	0
轮虫 Rotifera					
角突臂尾轮虫 <i>Brachionus angularis</i>	1	1	1	1	1
剪形臂尾轮虫 <i>Brachionus forficula</i>	1	1	1	1	1
彩胃轮虫 <i>Chromogaster</i> sp.	1	1	1	1	1
多态胶鞘轮虫 <i>Collotheca ambigua</i>	1	1	1	1	1
对棘同尾轮虫 <i>Diurella sulcata</i>	1	1	0	0	0
螺形龟甲轮虫 <i>Keratella cochlearis</i>	1	1	1	1	1
单趾轮虫 <i>Monostyla</i> sp.	1	0	0	0	1
针簇多肢轮虫 <i>Polyarthra trigla</i>	1	1	1	1	1
橘色轮虫 <i>Rotaria citrine</i>	1	1	1	0	0
圆筒异尾轮虫 <i>Trichocerca cylindrical</i>	0	0	0	1	1
纵长异尾轮虫 <i>Trichocerca elongate</i>	1	1	0	0	0
巨腕轮虫 <i>Pedalia</i> sp.	1	1	0	1	1
刺盖异尾轮虫 <i>Trichocerca capucina</i>	1	0	0	0	0
异小暗尾轮虫 <i>Trichocerca pusilla</i>	0	0	0	0	1
方块鬼轮虫 <i>Trichotria tetractris</i>	1	0	0	0	0
蛭态类 <i>Bdelloidea</i> sp.	0	1	0	0	0
枝角类 Cladocera					
尖额溞 <i>Alona</i> sp.	0	0	0	1	0
脆弱象鼻溞 <i>Bosmina fatalis</i>	1	0	0	0	0
桡足类 Copepoda					
剑水蚤 <i>Cyclopoida</i> sp.	1	0	0	0	0
无节幼体 Nauplius	1	1	1	1	1

表 2 各样点扩增结果(1 代表有谱带, 0 代表没有谱带)

Tab.2 Amplified results of samples (1 stands for presence, 0 stands for absence)

OPM-1	OPM-3	OPM-10	OPM-12	OPM-13	OPG-8	OPG-10	OPG-17	OPG-19
A0001011111110	10101111101	010100011011001111	0111111101010	1011011011101110	011110101111110	10011111110111	001101011011110	00110111110
B1001111101100	01011111111	101100111010101111	1111111101001	1011010011111000	011110101111111	01010111111011	011001011111111	01011111000
C0111111101110	01111101110	001011011011001111	0111111101100	1010111001111100	111101111101000	00110111111101	011011011011111	00111111100
D0011110100100	01111100110	000010011101001110	0111111110100	1011010101111111	011110101100110	00110111111111	111001111011111	10011111100
E0011111101111	11111101110	011010011011011010	1111111111010	1110110111110111	011101101111110	00110111111101	111001011011110	00111111101

2.3 PCR-DGGE 指纹分析

PCR-DGGE 指纹分析共获得 87 条扩增谱带, 其中原核谱带 50 条, 多态率为 86%, 特有带为 16 条, 占总带谱的 32%; 真核谱带 37 条, 多态率为 64.9%, 特有带为 9 条, 占总带谱的 24.3%(图 2).

2.4 聚类分析

尽管形态学鉴定和 DNA 指纹分析都表现出较高的物种多样性, 但其相似性聚类却存在差别. (1)物种组成的聚类结果显示: 5 个站点可聚为三类, B、C 两站聚为一类, D、E 两站聚为一类, A 站与其它各站相似性最低单独为一类(图 3a); (2) RAPD 和 PCR-DGGE 指纹分析的 UPGMA 聚类均显示: C、D、E 三站相似性较高聚为一类, A 和 B 两站为另一类(图 3d, 3e).

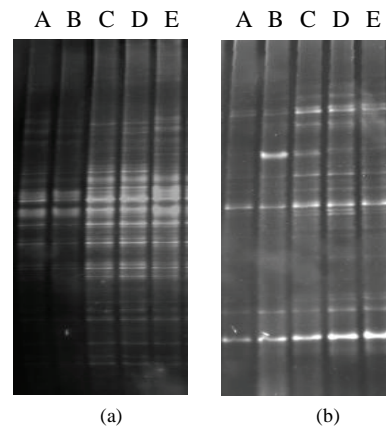


图 2 16S rDNA(a)和 18S rDNA(b)PCR-DGGE 指纹图谱
Fig.2 PCR-DGGE profiles of 16S rDNA (a) and 18S rDNA (b)

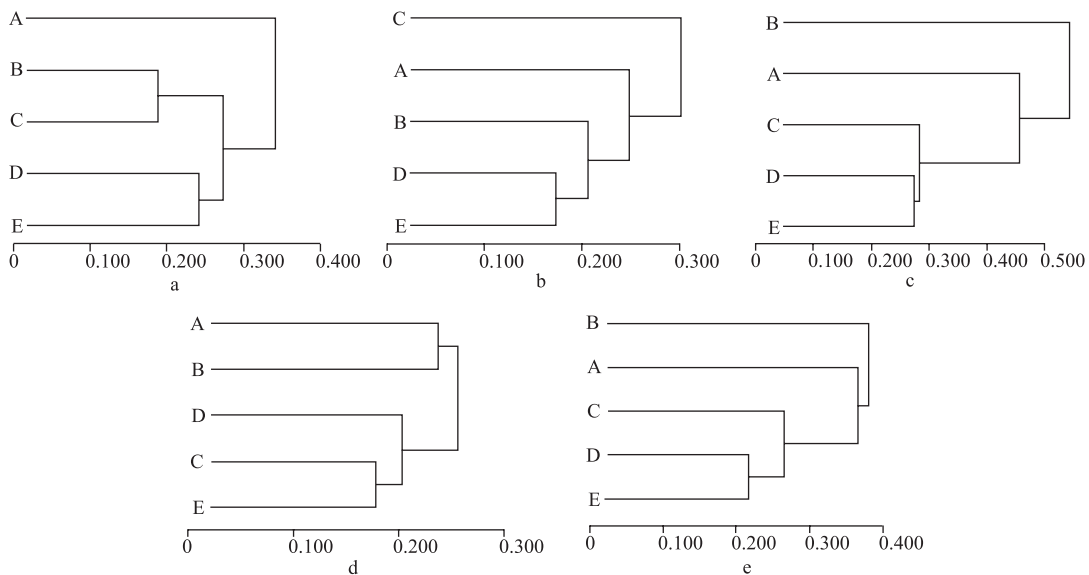


图 3 多福转基因鱼试验湖泊浮游生物群落 UPGMA 聚类

(a: 基于物种组成; b: 基于 18S rDNA 标记; c: 基于 16S rDNA 标记; d: 基于 RAPD 标记;
e: 基于 18S rDNA 和 16S rDNA 总 PCR-DGGE 标记)

Fig.3 The UPGMA clustering of the plankton community from different sites in the transgenic lake

3 讨论

水体生态系统有一定的演替规律, 转基因鱼的引入可能会干扰它的种群结构和演替过程, 也可能破坏其生物多样性和遗传稳定性^[17]. 多福农庄转基因鱼试验湖是一个以梁子湖为生物背景的人工模拟湖泊, 引入转基因鱼以研究其对环境和其它物种的影响, 评价其生态安全性. 浮游生物作为水体生态系统中的基本类群, 对维持水生态平衡起到重要作用^[1]. 因而浮游生物群落物种组成的多样性及其与转基因鱼之间的上、下行效应不容忽视. 随着分子生物学技术的迅猛发展, DNA 指纹技术被成功地应用于生物多样性的研究, 这不仅突破传统的研究方法揭示了越来越丰富的生物多样性, 也为阐释生物群落与环境之间的关系提供新的视野^[18].

本研究采用传统的形态学方法以及 RAPD 与 PCR-DGGE 两种 DNA 指纹技术研究转基因鱼试验湖中浮游生物的多样性, 并通过相似性聚类分析各站物种组成关系. 结果显示: 形态学鉴定中 B、C 两站和 D、E 两站的物种组成相似性较高, 各聚为一类, A 站单独归为一类(图 3a). 而群落总 DNA 经指纹技术分析后聚类结果却显示 C、D、E 三站物种组成相似, 聚为一类, 另外两站的物种组成较相近(图 3d, 3e). 理论上, 如果两站的浮游生物群落的物种组成相似, 其总 DNA 指纹拓扑结构应趋于相似, 但本试验所得的物种组成和 DNA 指纹分析(RAPD 和 PCR-DGGE 分析)聚类结果却有差异. 笔者认为造成此结果的原因可能在于: 一方面, 传统的形态学方法费时费力, 同时需要较强的专业知识背景, 而且某些个体微小的生物种群, 会因其形态特征不明显等原因易被遗漏; 另一方面, 本研究中的两种 DNA 指纹技术是以群落的全基因组为研究对象的, 因而能够揭示更丰富的物种多样性, 并已成功用于微型浮游生物等种群的研究^[20]. 尽管 RAPD 和 PCR-DGGE 的聚类分析结果大致相似, 但仍存细微差别: 在 RAPD 聚类分析中(图 3d)A、B 两站是聚在一起的, 而在 PCR-DGGE 聚类分析中(图 3e)尽管 A、B 两站距离较近, 但仍分别为一类. 这可能与两种 DNA 指纹技术本身有关: RAPD 是对全基因组的随机扩增, 而 PCR-DGGE 是以通用真核引物和通用原核引物对群落基因组进行扩增, 原理上的不同可能使结果出现差异.

为进一步说明三种方法的区别和联系, 笔者将 PCR-DGGE 中的 18S rDNA 分析和 16S rDNA 分析分别聚类(图 3b, 3c), 并与物种组成聚类(图 3a)和 RAPD 分析聚类(图 3d)进行比较. 经比较发现: 物种组成聚类与 18S rDNA 聚类、16S rDNA 聚类都未呈现相关性; RAPD 聚类与 16S rDNA 聚类结果相关性较高, 而与 18S rDNA 聚类不相关. 理论上, 形态学鉴定和 18S rDNA 分析都是针对真核生物, 其聚类结果应该相似, 事实却有悖于理论. 这可能是由于 18S rDNA 的 DGGE 分析灵敏度高于形态学鉴定方法, 故所得物种多样性较丰富, 聚类结果出现差异. Savin 等^[19]认为分子技术更适合于研究一些广泛分布, 却又难以鉴定的生物类群. 颜庆云等^[12]研究得出 PCR-DGGE 指纹技术比传统形态学方法所得物种丰富. Moon-van der Staay SY 等^[21]通过 18S rDNA 序列研究海洋中小型浮游生物, 发现了以前未鉴定到的物种. 对于 RAPD 指纹技术与 16S rDNA 聚类呈现相关性的结果, 可能是群落总 DNA 中原核生物的 DNA 含量较多, 故在 PCR 随机扩增过程中竞争力强, 呈现优势效应. 颜庆云等^[22]在对转基因鱼试验湖中优势种进行探讨时, 发现 RAPD 指纹拓扑结构与优势种种类组成一致, 与这一结果相近.

综上所述, 形态学鉴定和 DNA 指纹技术在本研究中未呈现显著相关, 后者能够揭示更丰富的物种多样性, 但毫无疑问三种方法可以从不同方面表征群落结构. 这将为研究转基因鱼试验湖泊中浮游生物群落结构和功能关系提供坚实依据, 为进一步评价转基因鱼的生态安全性及其对饵料生物的影响奠定技术基础.

4 参考文献

- [1] Zehr JP, Voytek MA. Molecular ecology of aquatic communities: reflections and future directions. *Hydrobiologia*, 1999, **401**: 1-8.
- [2] Yan QY, Yu YH, Feng WS. Genetic fingerprinting of plankton community provides new insights into aquatic ecology. *Prog Nat Sci*, 2006, **16**(9): 893-898.
- [3] Guo PY, Shen HT, Liu AC *et al.* The species composition, community structure and diversity of zooplankton in changjiang estuary. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(5): 892-900.

- [4] Lin QQ, Hu R, Duan SS *et al.* Reservoir trophic states and the response of plankton in Guangdong Province. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(6): 1101-1108.
- [5] 赵帅营, 韩博平. 大型深水贫富养水库——新丰江水库浮游动物群落分析. *湖泊科学*, 2007, **19**(3): 305-314.
- [6] 徐兆礼. 长江口邻近水域浮游动物群落特征及变动趋势. *生态学杂志*, 2005, **24**(7): 780-784.
- [7] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4800-4806.
- [8] Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Yan QY, Yu YH, Feng WS *et al.* DNA polymorphism of the plankton community and its relationship to species composition in the three gorges reservoir region of Yangtze River. *J Freshw Ecol*, 2006, **21**(3): 385-390.
- [12] Yan QY, Yu YH, Feng WS *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. *Mirob Ecol*, 2007, **54**(2): 290-297.
- [13] Yu YH, Yan QY, Feng WS. Spatiotemporal heterogeneity of plankton communities in Lake Donghu, China, as revealed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and its relation to biotic and abiotic factors. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **63**: 328-337.
- [14] Yan QY, Yu YH, Feng WS *et al.* Plankton community composition in three gorges reservoir region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors. *J Environ Sci*, 2008, **20**: 732-738.
- [15] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(20): 6531-6535.
- [16] van Hannen EJ, van Agterveld MP, Gons HJ *et al.* Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Phycol*, 1998, **34**(2): 206-213.
- [17] 朱作言, 曾志强. 转基因鱼离市场还有多远. *生物技术通报*, 2000, **17**(1): 1-6.
- [18] Theron J, Cloete TE. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit Rev Microbiol*, 2000, **26**(1): 37-57.
- [19] Savin MC, Martin JL, LeGresley M *et al.* Plankton diversity in the bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *FEMS Microb Ecol*, 2004, **48**(1): 51-65.
- [20] Lindström ES. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microb Ecol*, 1998, **27**(2): 163-173.
- [21] Moon-van der Staay SY, Vaultot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 2001, **409**: 607-610.
- [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.