

# 基于多个扩增子的 DNA metabarcoding 技术探究黄海微型真核浮游植物多样性

张莉<sup>1,2,3</sup>, 张远<sup>1\*</sup>, 林佳宁<sup>1</sup>, 王书平<sup>1</sup>

(1. 中国环境科学研究院河流生态保护与修复研究室, 北京 100012; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 微型真核浮游植物是海洋生态系统中能量流动和物质循环的关键环节, 对维持海洋生态系统的稳定发挥着关键的作用. 本研究首次应用 DNA metabarcoding 技术探讨黄海微型真核浮游植物的物种组成及多样性, 对比分析 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子条件下微型真核浮游植物的群落结构及多样性水平, 并探讨了其多样性与温度、盐度的响应关系. 结果表明: ① 基于 ITS 扩增子获得的微型真核浮游植物中绿藻门所占比例较高, 而基于 18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子获得的甲藻门相对丰度较高. ② 基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数较 ITS 和 18S rDNA V4 扩增子更高, 而且其门、纲、目和科的数目较高. ③ 黄海微型真核浮游植物的 Shannon 指数与温度呈现出显著正相关的关系 ( $P < 0.01$ ), 而与盐度呈现出显著负相关的关系 ( $P < 0.05$ ). 本研究通过对比不同扩增子条件下黄海微型真核浮游植物的群落结构及丰度特征, 丰富了黄海微型真核浮游植物的认识, 可为今后该海域微型真核浮游植物的生态学研究、生物多样性监测、生物资源动态变化及持续开发生产等方面的分析提供科学依据.

**关键词:** 微型真核浮游植物; DNA metabarcoding; ITS; 18S rDNA V4; 18S rDNA V9; 多样性

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)09-4052-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.201811025

## Community Diversity of Eukaryotic Nano-phytoplankton in Yellow Sea Using DNA Metabarcoding Technology Based on Multiple Amplicons

ZHANG Li<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yuan<sup>1\*</sup>, LIN Jia-ning<sup>1</sup>, WANG Shu-ping<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Riverine Ecological Conservation and Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Eukaryotic nano-phytoplankton plays an indispensable role in energy flow, material circulation, and stability maintenance of marine ecosystems. In this research, DNA metabarcoding technology was applied to elucidate the distribution features of eukaryotic nano-phytoplankton in the Yellow Sea for the first time. The community structure and diversity of eukaryotic nano-phytoplankton were compared based mainly on amplicons of internal transcribed spacer (ITS), 18S rDNA V4 and 18S rDNA V9. Analysis of the correlation between diversity and temperature/salinity was performed as well. The following results were noted. ① Higher proportions of Chlorophyta were obtained based on the ITS region compared with other two amplicons, while the relative abundance of Dinoflagellata was larger when 18S rDNA V4 and 18S rDNA V9 regions were applied. ② The abundance-based coverage estimators (ACE), Chao1, Shannon diversity, and Simpson diversity indices were significantly higher based on the amplicon of 18S rDNA V9 than those based on ITS and 18S rDNA V4. The numbers of phyla, classes, order, and families were larger when the 18S rDNA V9 region was applied. ③ Based on the amplicons of ITS, 18S rDNA V4, and 18S rDNA V9, the Shannon diversity index showed a significant positive correlation with temperature ( $P < 0.01$ ), indicating that as the temperature increased, the diversity of the eukaryotic nano-phytoplankton increased. The tendency was opposite for salinity, however. With an increase in salinity, the Shannon diversity index decreased significantly ( $P < 0.05$ ). This research compared the community structure and diversity of eukaryotic nano-phytoplankton under different amplicons and will provide a scientific basis for ecological studies of eukaryotic nano-phytoplankton, monitoring of biodiversity and dynamic changes of biological resources, and sustainable development.

**Key words:** eukaryotic nano-phytoplankton; DNA metabarcoding; ITS; 18S rDNA V4; 18S rDNA V9; biodiversity

微型真核浮游植物 (eukaryotic nano-phytoplankton) 通常指的是粒径小于 20  $\mu\text{m}$  的真核浮游植物, 其处于海洋生态系统食物链的底端<sup>[1]</sup>, 是能量流动和物质循环的关键环节<sup>[2]</sup>, 对维持海洋生态系统的稳定发挥着重要的作用<sup>[3,4]</sup>. 其个体微小, 细胞结构简单<sup>[5,6]</sup>; 其丰度的变化受自身生物学特性以及外界环境因素如温度、盐度等的影

响<sup>[7]</sup>, 种类和数量的变化能快速反映海洋生态系统的健康状况<sup>[8,9]</sup>. 研究微型真核浮游植物的群落结构及多样性水平是研究海洋生态环境问题的基础,

收稿日期: 2018-11-04; 修订日期: 2019-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(41571050)

作者简介: 张莉(1993-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为流域水生生态保护技术, E-mail: zhangli\_03\_18@163.com

\* 通信作者, E-mail: zhangyuan@caes.org.cn

对解决海洋生态环境和海洋生物资源问题具有重要的意义。

DNA metabarcoding 技术是从环境样品中提取全部生物的 DNA, 针对研究对象的 DNA 条形码区域进行特异性引物扩增, 通过高通量测序技术获得物种序列, 并结合开放数据库对物种序列进行注释的新型技术<sup>[10]</sup>。该技术结合 DNA barcoding 技术和高通量测序技术, 可实现物种多样性的快速检测<sup>[11]</sup>。Zimmermann 等<sup>[12]</sup>于 2014 年对比分析形态学方法和 DNA metabarcoding 技术研究奥德拉河和尼萨河硅藻的群落结构及多样性, 发现 DNA metabarcoding 技术能监测到更多的硅藻物种。Saunders 等<sup>[13]</sup>应用 DNA metabarcoding 技术探讨加拿大海区浮游植物种类时, 发现该海区的入侵物种为白蒙藻科和江蓠目藻种, 证实了 DNA metabarcoding 技术在监测入侵物种方面的潜力与重要地位。

关于黄海海域微型真核浮游植物的研究多采用扩增核糖体 DNA 限制性分析技术(ARDRA)<sup>[14]</sup>、流式细胞术<sup>[15]</sup>和 Utermöhl 方法<sup>[16]</sup>等, 不难发现, 其研究技术手段存在一定的局限性, 不能全面揭示该海域微型真核浮游植物的物种组成及多样性, 因此亟需应用更为先进的技术手段探讨黄海微型真核浮游植物的分布特征。本研究首次应用 DNA metabarcoding 技术分析黄海微型真核浮游植物群落结构及多样性, 通过丰富微型真核浮游植物的认识, 证实该技术在该海域微型真核浮游植物研究的适用性, 因此开展本研究具有重要的生态学意义与里程碑意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2016 年 8 月于黄海及杭州湾以东海域布置 32 个采样点位, 分布于北黄海(A-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6)、冷水团(B-1、B-2、B-3、B-4、B-5)、南黄海(C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9)和东东北部(D-1、D-2、D-3、D-4、D-5、D-6、D-7、D-8、D-9、D-10、D-11、D-12)。每个点位各采集表层(0~2 m)海水 3 次, 每次采集 4 L, 混合后取 3 L 用于后续操作。使用孔径为 200  $\mu\text{m}$  的纱绢进行过滤, 去除颗粒较大的悬浮物; 通过 20  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜(Millipore, USA)过滤(<0.03 MPa), 2 h 内完成。将过滤好的膜置于无菌冻存管中, 液氮保存, 干冰运输。同时, 采用温盐深仪 CTD(SBE, USA)现场测定每个点位的温度、盐度, 各点位采集数据 3 次, 取其平均值。采

样点详见图 1。

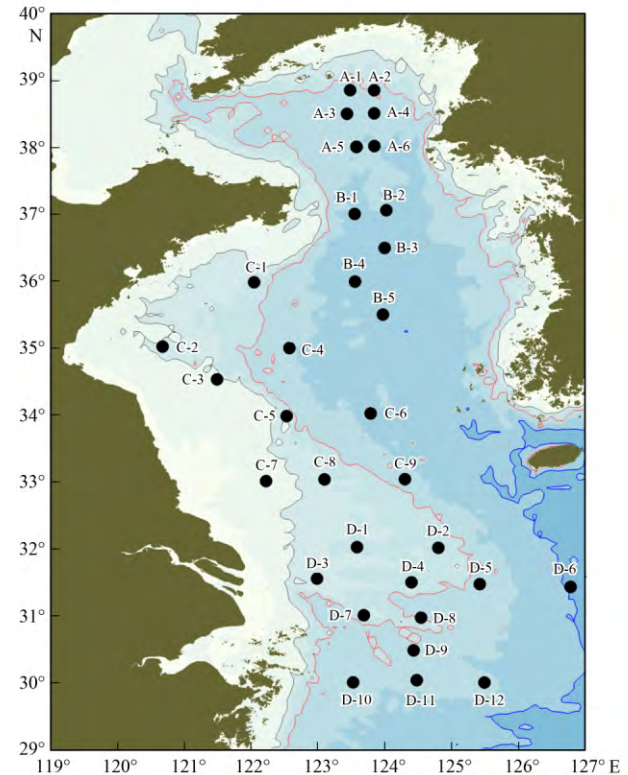


图 1 黄海采样点分布示意

Fig. 1 Location of sampling sites in the Yellow Sea

### 1.2 DNA 的提取、纯化

将冻存管中的滤膜转移至 2 mL 无菌离心管中, 通过 DNA 裂解液裂解、蛋白酶 K 酶解、FastPrep-5G 破碎仪(MP Biomedicals, USA)破碎等方法破碎样品, 依据 Yuan 等<sup>[17]</sup>采取的方法提取、纯化样品中的 DNA。使用 Nano Drop 2000(Thermo Fisher Scientific, USA)检测 DNA 样品的浓度, 并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

### 1.3 PCR 扩增、Illumina 测序

以每个样品的 DNA 原液(50ng)为模板, 分别对 ITS 区、18S rDNA V4 区和 18S rDNA V9 区进行扩增, 所采用的引物均为真核生物通用引物, 其中 ITS 区的引物序列为 F: 5'-GTGAATCATCGARTC-3', R: 5'-TCCTCCGCTTATTGAT-3'<sup>[18]</sup>; 18S rDNA V4 区的引物序列为 F: 5'-GGCAAGTCTGGTGCC-3', R: 5'-ACGGTATCTRATCRTC-3'<sup>[19]</sup>; 18S rDNA V9 区的引物序列为 1380F: 5'-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3', 1510R: 5'-CCTTCYGCAGGTTACCTAC-3'<sup>[20]</sup>。上述引物由 GENEWIZ 公司合成。

PCR 反应条件为: 96°C 预变性 3 min; 96°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72°C 延伸 7 min; 4°C 保存。PCR 产物的纯化、浓度检测参考文献[21]。分别对 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 构建高通量文库并进行 Illumina 测序

(苏州金唯智生物科技有限公司)。

#### 1.4 数据处理

(1) 数据质量控制 使用 QIIME (quantitative insights into microbial ecology) 软件对 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 的原始序列进行过滤。根据测序质量文件, 设置引物错配容错为 3, 去除 8 个以上连续相同的碱基, 设定保留长度范围进行筛选。通过拼接(保证至少有 20bp 的重叠区)、去引物、去接头序列、去长度小于 200bp 的序列、去嵌合体序列(chimera sequence)、剔除含有 N 及低质量得分的序列等方法, 得到高质量的序列。

(2) OTUs 聚类 应用软件 VSEARCH 1.9.6 对高质量序列在 97% 的相似性水平上进行聚类, 产生可操作性分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 将其应用于后续的分析过程。

(3) OTUs 物种信息注释 以每个 OTUs 中最长的序列作为代表性序列, 通过 BLAST 在 NCBI 数据库中查找同源序列, 将最相近且可信度达到 80% 以上序列的种属信息<sup>[22]</sup>, 作为该 OTUs 的物种注释信息。由于引物具有高通用性, 注释为古细菌、有胚植物、真菌、浮游动物等 OTUs 序列在本研究中舍弃。

(4) 利用 Mothur 软件计算 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数。通过条形图分析基于不同扩增子微型真核浮游植物在门、纲、目和科分类水平上的群落分布状况, 箱体图探讨在不同的扩增子条件下微型真核浮游植物的多样性及丰度特征。应用散点图分析温度、盐度对微型真核浮游植物多样性的影响。其中条形图、箱体图在软件 Origin 8.0 中进行, 散点图、Spearman 相关性分析在软件 SPSS 19.0 中完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于多个扩增子黄海微型真核浮游植物的群落结构特征

基于不同的扩增子, 对比分析在门、纲、目和科分类阶元上黄海微型真核浮游植物的物种组成(图 2)。本研究发现, 在不同的扩增子条件下, 黄海微型真核浮游植物的群落结构组成差异性较大。在门分类阶元上[图 2(a)], 以 ITS 为扩增子获得的微型真核浮游植物以绿藻门(Chlorophyta)和定鞭藻门(Haptophyta)为主, 占总丰度的比例分别为 77% 和 20%; 以 18S rDNA V4 为扩增子获得微型真核浮游植物主要包括甲藻门(Dinoflagellata)、异鞭藻门(Heterokontophyta)和定鞭藻门(Haptophyta)等, 其中甲藻门(Dinoflagellata) 所占比例最大, 为

65%, 其次为异鞭藻门(Heterokontophyta, 10%); 以 18S rDNA V9 为扩增子获得的微型真核浮游植物主要为甲藻门(Dinoflagellata, 60%)、绿藻门(Chlorophyta, 15%)、异鞭藻门(Heterokontophyta, 10%)和定鞭藻门(Haptophyta, 7%)。

在纲分类阶元上[图 2(b)], 以 ITS 为扩增子获得的微型真核浮游植物相对丰度较高的纲为绿枝藻纲(Prasinophyceae)、定鞭藻纲(Haptophyceae)、Mamiellophyceae 和绿藻纲(Chlorophyceae), 所占比例分别为 60%、19%、10% 和 6%; 以 18S rDNA V4 为扩增子得到的微型真核浮游植物丰度所占比例较高的纲为甲藻纲(Dinophyceae, 75%)、真眼点藻纲(Eustigmatophyceae, 11%) 和定鞭藻纲(Haptophyceae, 6%); 以 18S rDNA V9 为扩增子获得的微型真核浮游植物主要纲为甲藻纲(Dinophyceae)、绿枝藻纲(Prasinophyceae)、真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)、Clade\_VII 和定鞭藻纲(Haptophyceae), 所占比例分别为 61%、8%、7%、6% 和 6%。

在目分类阶元上[图 2(c)], 基于 ITS 扩增子获得的微型真核浮游植物相对丰度较高的目为 Pyramimonadales、等鞭金藻目(Isochrysidales)、四孢藻目(Tetrasporales)、Mamiellales 和绿球藻目(Chlorococcales)等, 所占比例分别为 13%、20%、18%、18% 和 7%; 基于 18S rDNA V4 扩增子获得的微型真核浮游植物主要包括寄生藻目(Syndiniales, 31%)、膝沟藻目(Gonyaulacales, 23%)、真眼点藻目(Eustigmatales, 13%)、裸甲藻目(Gymnodiniales, 8%) 和 Suessiales(7%)等; 基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物主要包括寄生藻目(Syndiniales, 24%)、多甲藻目(Peridiniales, 11%)、裸甲藻目(Gymnodiniales, 11%)、真眼点藻目(Eustigmatales, 9%)、Pseudoscourfieldiales(9%) 和 鳍藻目(Dinophysiales, 6%)等。

在科分类阶元上[图 2(d)], 基于 ITS 扩增子获得的微型真核浮游植物主要包括等鞭金藻科(Isochrysidaceae)、四孢藻科(Tetrasporaceae)、Mamiellaceae 和金色藻科(Chrysochromulinaceae)等, 所占比例分别为 22%、20%、19% 和 11%; 基于 18S rDNA V4 扩增子获得的微型真核浮游植物相对丰度较高的科为膝沟藻科(Gonyaulaceae, 27%)、Syndiniales\_Group\_I(24%)、Suessiaceae(8%)、裸甲藻科(Gymnodiniaceae, 7%)、鳍藻科(Dinophysiaceae, 5%) 和定鞭金藻科(Prymnesiaceae, 4%)等; 基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物相对丰度较高的为

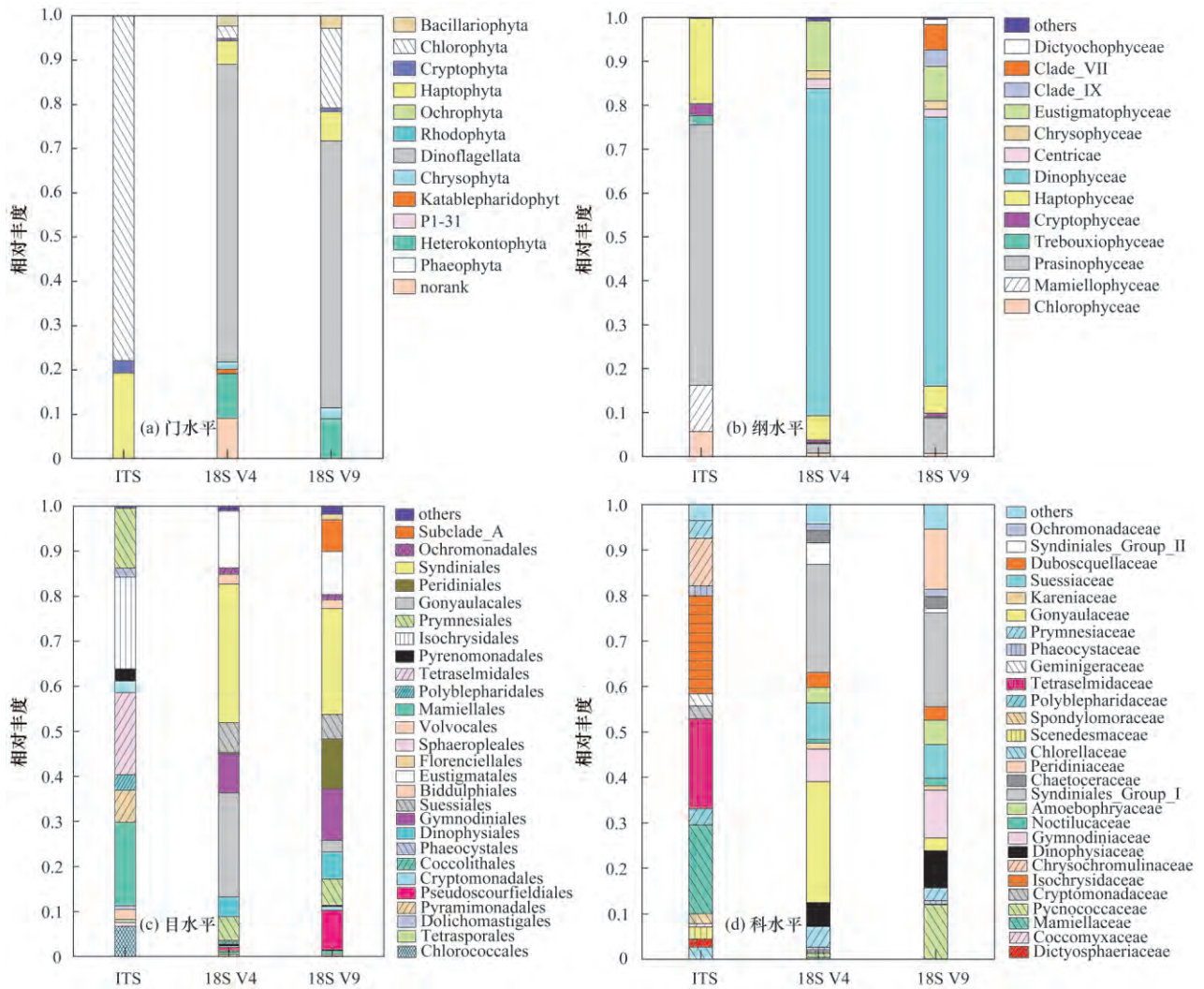


图2 基于 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子微型真核浮游植物在门、纲、目和科分类阶元的相对丰度状况

Fig. 2 Proportions of eukaryotic nano-phytoplankton at phylum ,class ,order ,and family level based on amplicons of ITS ,18S rDNA V4 ,and 18S rDNA V9

Syndiniales \_ Group \_ I ( 21%)、多甲藻科 ( Peridiniaceae , 13%)、Pycnococcaeae( 12%)、裸甲藻科 ( Gymnodiniaceae , 11%)、鳍藻科 ( Dinophysiaceae , 8%)、Suessiaceae( 7%)、阿米巴藻科 ( Amoeboophryaceae , 5%) 和定鞭金藻科 ( Prymnesiaceae , 3%) 等。

### 2.2 基于多个扩增子黄海微型真核浮游植物的多样性特征

基于 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数，探讨在不同的扩增子条件下微型真核浮游植物的多样性特征。本研究结果表明 (图 3 和图 4)，基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均显著高于 ITS 和 18S rDNA V4 扩增子获得的微型真核浮游植物的多样性指数 ( $P < 0.05$ )。另外，本研究发现点位 D-1 和 D-7 的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均显著高于其他点位，点位 A-3 的上述指数均

显著低于其他点位。

### 2.3 不同水域黄海微型真核浮游植物的丰度特征

由图 5 可以发现，基于不同扩增子黄海各水域微型真核浮游植物的丰度存在差异性。基于 ITS 扩增子，微型真核浮游植物的 Reads 数呈现出北黄海 > 冷水团 > 东黄北部 > 南黄海的趋势，OTUs 则表现为东黄北部 > 南黄海 > 北黄海 > 冷水团的变化。不难发现，北黄海微型真核浮游植物的 Reads 数最高，但 OTUs 数目较低；而东黄北部水域则相反，OTUs 数目较为丰富，但 Reads 数较低。以 18S rDNA V4 为扩增子，黄海微型真核浮游植物 Reads 数在不同水域间呈现的变化趋势为北黄海 > 南黄海 > 东黄北部 > 冷水团，而 OTUs 则为南黄海 > 东黄北部 > 冷水团 > 北黄海。以 18S rDNA V9 为扩增子，不同水域间微型真核浮游植物的 Reads 数和 OTUs 则呈现出与 18S rDNA V4 扩增子较为一致的变化趋势。

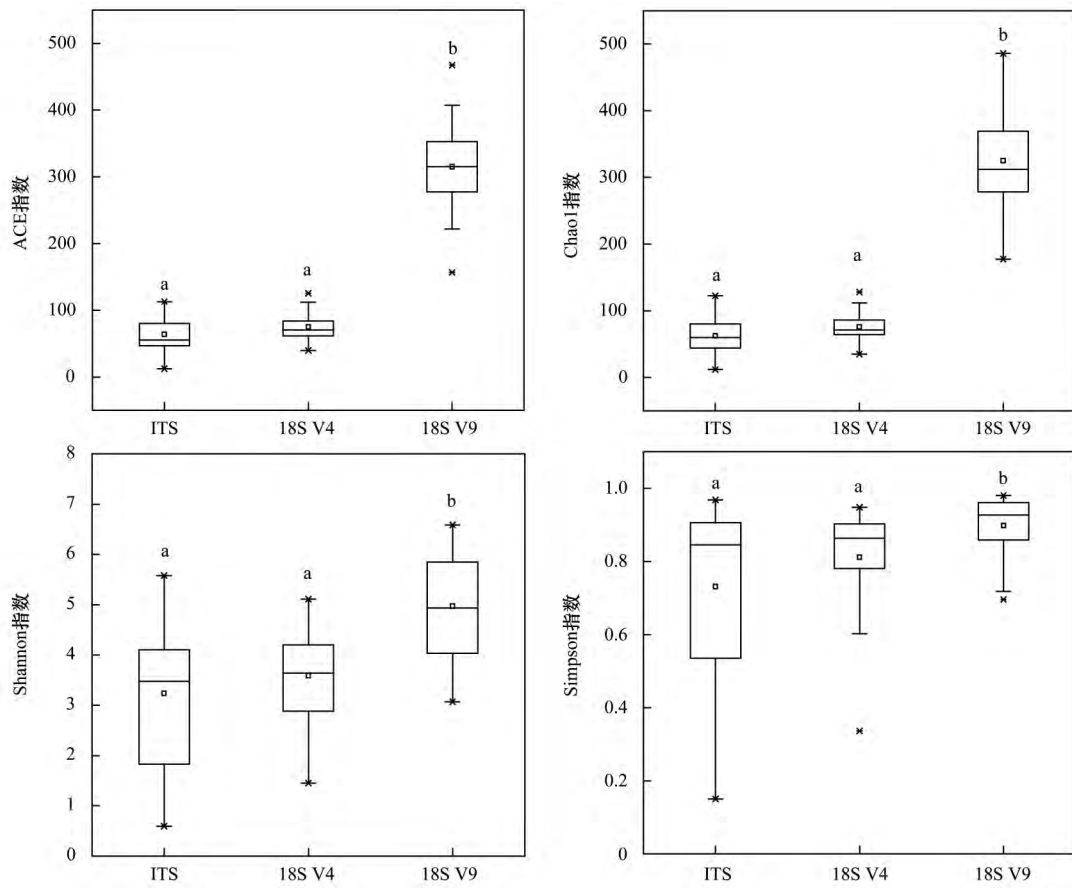


图 3 基于 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数的变化

Fig. 3 Variation of ACE , Chao1 , Shannon , and Simpson indices based on amplicons of ITS , 18S rDNA V4 , and 18S rDNA V9

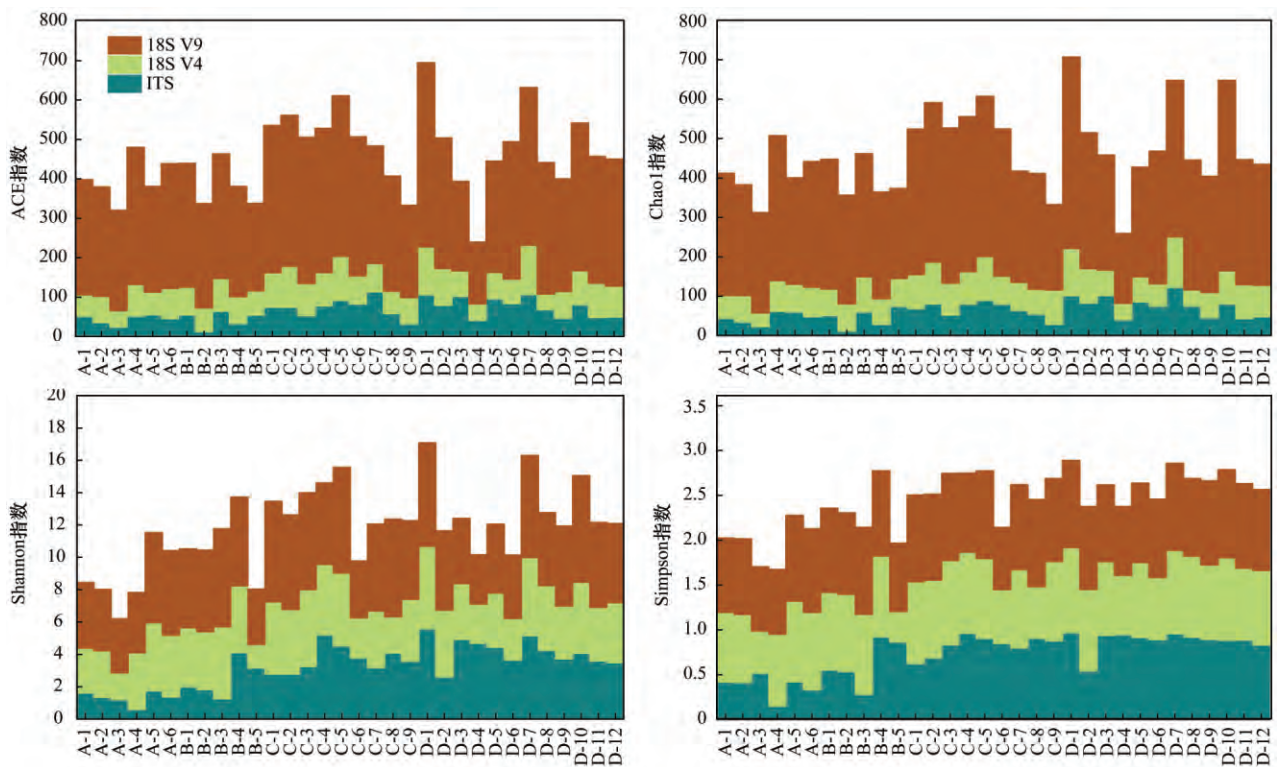
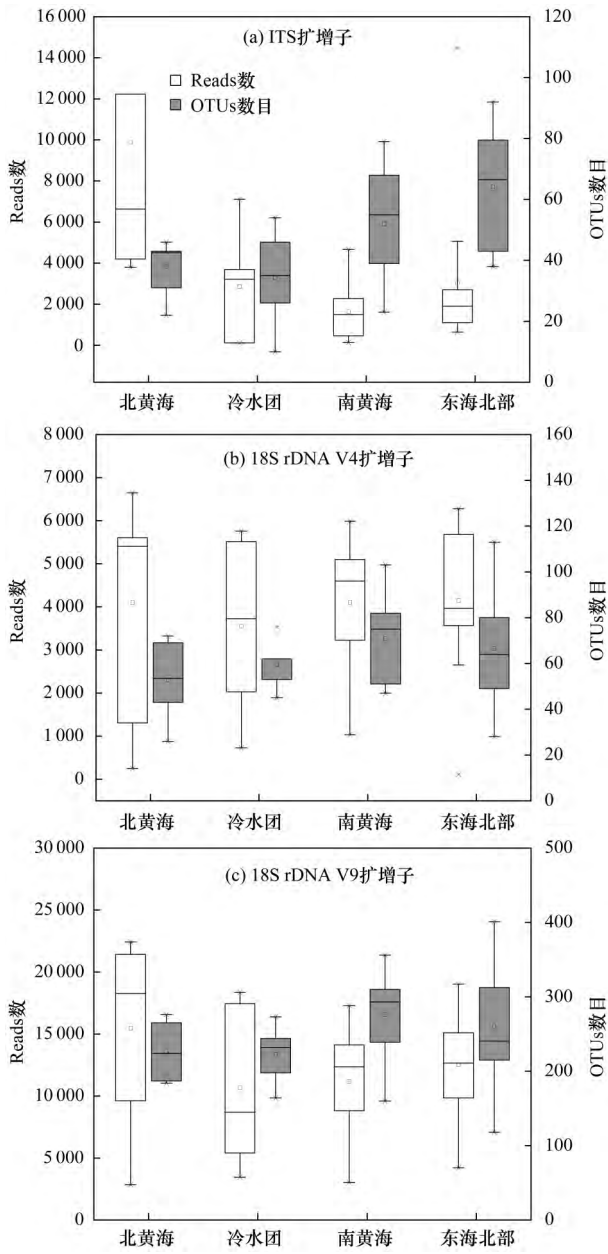


图 4 基于 ITS、18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子各点位 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数的变化

Fig. 4 Variation of ACE , Chao1 , Shannon , and Simpson indices based on amplicons of ITS , 18S rDNA V4 , and 18S rDNA V9 at different sampling sites



红色箱体表示 Reads 数, 蓝色箱体表示 OTUs 数目

图 5 黄海不同水域微型真核浮游植物的丰度特征

Fig. 5 Richness features of eukaryotic nano-phytoplankton in different waters of the Yellow Sea

### 2.4 黄海微型真核浮游植物多样性与温度、盐度的响应关系

本研究发现(表 1 和图 6), 随着温度的升高, 基于不同扩增子获得的微型真核浮游植物 Shannon

表 1 微型真核浮游植物 Shannon 指数与温度、盐度的相关性分析<sup>1)</sup>

Table 1 Correlation of Shannon index of eukaryotic nano-phytoplankton with temperature and salinity

项目	Shannon 指数		
	ITS 扩增子	18S V4 扩增子	18S V9 扩增子
温度	0.599**	0.460**	0.495**
盐度	-0.379*	-0.378*	-0.391*

1) \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$

指数均呈现出显著上升的趋势 ( $P < 0.01$ ), 说明微型真核浮游植物的 Shannon 指数与温度显著正相关。随着盐度的升高, 微型真核浮游植物的 Shannon 指数均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 说明微型真核浮游植物的多样性与盐度显著负相关。

### 3 讨论

#### 3.1 基于多个扩增子黄海微型真核浮游植物的群落结构及多样性特征

研究发现, 基于不同扩增子获得的微型真核浮游植物群落结构差异性较大, 基于 ITS 获得的微型真核浮游植物以绿藻门和定鞭藻门为主, 而基于 18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物以甲藻门和异鞭藻门为主。张宛宛<sup>[23]</sup> 在研究太湖真核浮游植物群落结构时发现, 基于 ITS 区扩增得到的真核浮游植物主要门类为绿藻门和隐藻门, 比例高达真核浮游植物的 99%, 与本研究结果具有一致性。Piredda 等<sup>[24]</sup> 基于 18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子对比分析地中海原生生物的物种组成, 发现在不同的扩增子条件下, 甲藻门 Reads 数占总 Reads 数的比例不同, 该比例基于 18S rDNA V4 扩增子为 56%, 而在 18S rDNA V9 扩增子条件下为 34%, 而且在不同的季节其比例也存在差异性。王靖淇等<sup>[25]</sup> 应用 18S rDNA V9 扩增子探讨了渤海海域真核浮游藻类的物种组成及多样性, 发现该海域真核浮游藻类的优势类群为甲藻门, 丰度比例高达 46.62%。

本研究同时探讨了在不同的扩增子条件下, 黄海微型真核浮游植物的物种丰度及多样性, 发现基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均显著高于 ITS 和 18S rDNA V4 扩增子 ( $P < 0.05$ ), 说明基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物的物种丰度及多样性最高, 而且其门、纲、目和科的数目较其他两个扩增子高。Piredda 等<sup>[24]</sup> 等在对比 18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子条件下原生物的多样性时, 同样发现 18S rDNA V9 扩增子获得的物种丰度较高。

#### 3.2 不同水域微型真核浮游植物的丰度特征

本研究结果表明, 以 ITS 为扩增子获得的微型真核浮游植物 Reads 数在不同水域间呈现出北黄海 > 冷水团 > 东海北部 > 南黄海的趋势, OTUs 则表现为东海北部 > 南黄海 > 北黄海 > 冷水团的变化; 以 18S rDNA V4 及 18S rDNA V9 为扩增子, 黄海微型真核浮游植物的 Reads 数均呈现出北黄海 > 南黄海 > 东海北部 > 冷水团的变化特点, 而 OTUs 则为

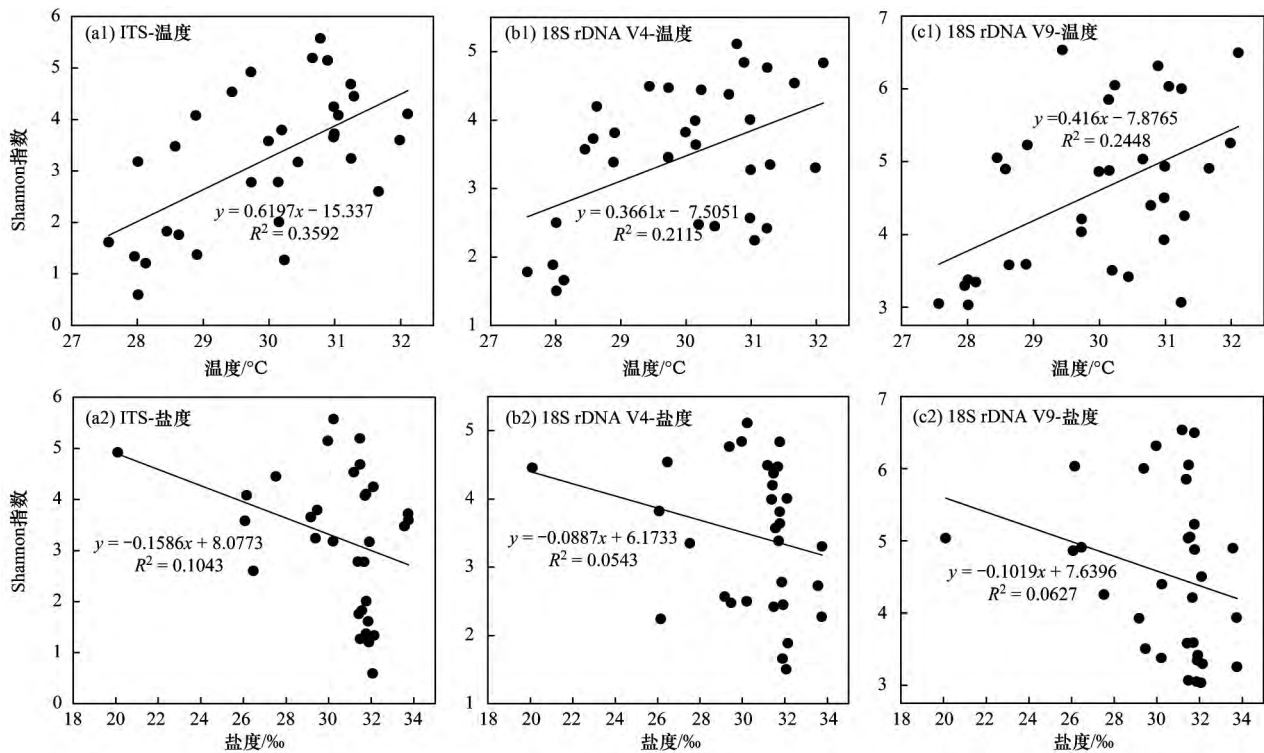


图6 黄海微型真核浮游植物 Shannon 指数与温度、盐度的关系

Fig. 6 Relationship of Shannon index of eukaryotic nano-phytoplankton and temperature and salinity

南黄海 > 东海北部 > 冷水团 > 北黄海。可以看出，基于不同的扩增子北黄海微型真核浮游植物的 Reads 数均高于其他 3 个水域，但其 OTUs 数目较低，而东海北部及南黄海水域 OTUs 数目较高。这可能与海水温度<sup>[26]</sup>和营养盐浓度<sup>[27]</sup>等有关。随着温度的升高，微型真核浮游植物的丰度及多样性呈现出增大的趋势。南黄海及东海北部水域水温高于北黄海及冷水团水域，较高的水温为微型真核浮游植物的增殖提供了必要条件，因此其 OTUs 数目较高。由于长江淡水的流入，南黄海及东海北部水域营养盐较为丰富<sup>[28-29]</sup>，这为微型真核浮游植物的生长提供了丰富的营养来源，促进了微型真核浮游植物的繁殖，因此 OTUs 数目较为丰富。北黄海及冷水团水域由于冷水团内部环流的扰动作用，表层营养盐较为匮乏<sup>[30]</sup>，浓度较低，导致微型真核浮游植物的丰度较低。

### 3.3 黄海微型真核浮游植物多样性与温度、盐度的响应关系

海水温度是最直接影响微型真核浮游植物生存的关键因素，它通过影响微型真核浮游植物体内酶的活性从而影响其代谢等生命活动<sup>[31]</sup>。本研究探讨了黄海微型真核浮游植物 Shannon 多样性与温度的响应关系，结果发现基于不同扩增子获得的微型真核浮游植物多样性均与温度呈现出显著正相关的关系，说明随着温度的升高，微型真核浮游植物的

多样性水平增大。郑白雯<sup>[26]</sup>在研究北部湾北部海域浮游植物群落多样性与环境因子关系时，发现温度对群落的多样性、丰富度和均匀度均具有显著的正影响( $P < 0.05$ )，证明随着温度的升高，群落的稳定性增强。

盐度对微型真核浮游植物的影响主要表现在细胞渗透压的改变，从而间接影响微型真核浮游植物细胞对营养盐的吸收速率<sup>[32]</sup>、生命活动和季节分布等<sup>[33]</sup>。本研究发现随着盐度的增大，黄海微型真核浮游植物的 Shannon 多样性指数显著下降( $P < 0.05$ )。张莉等<sup>[34]</sup>发现随着盐度的升高，黄海微型真核浮游植物的 OTUs 及 Reads 均呈现出显著下降的趋势( $P < 0.05$ )。屈佩<sup>[15]</sup>指出不同的季节浮游植物对盐度的响应不同，秋季浮游植物的物种丰度随着盐度的升高而下降。郑白雯<sup>[26]</sup>在探讨北部湾海域浮游植物群落多样性与盐度的关系时，同样指出盐度是影响该海域群落多样性的重要环境因子，而在夏季盐度对群落均匀度及丰富度具有显著的正影响( $P < 0.01$ )。

## 4 结论

(1) 基于 ITS 扩增子获得的微型真核浮游植物中绿藻门所占比例较高，而基于 18S rDNA V4 和 18S rDNA V9 扩增子获得的甲藻门相对丰度较高。

(2) 基于 18S rDNA V9 扩增子获得的微型真核浮游植物的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数

较 ITS 和 18S rDNA V4 扩增子更高,而且其门、纲、目和科的数目较高。

(3) 黄海微型真核浮游植物的 Shannon 多样性指数与温度呈现出显著正相关的关系 ( $P < 0.01$ ), 而与盐度呈现出显著负相关的关系 ( $P < 0.05$ )。

#### 参考文献:

- [1] Sieburth J M, Smetacek V, Lenz J, et al. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions [J]. *Limnology and Oceanography*, 1978, **23**(6): 1256-1263.
- [2] Ward B A, Dutkiewicz S, Jahn O, et al. A size-structured food-web model for the global ocean [J]. *Limnology and Oceanography*, 2012, **57**(6): 1877-1891.
- [3] Tilstone G H, Figueiras F G, Fermín E G, et al. Significance of nanophytoplankton photosynthesis and primary production in a coastal upwelling system (Ría de Vigo, NW Spain) [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, **183**: 13-27.
- [4] Falkowski P G, Laws E A, Barber R T, et al. Phytoplankton and their role in primary, new, and export production [A]. In: Fasham M J R (Ed.). *Ocean Biogeochemistry: The Role of the Ocean Carbon Cycle in Global Change* [M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. 99-121.
- [5] Tarran G A, Bruun J T. Nanoplankton and picoplankton in the Western English Channel: abundance and seasonality from 2007-2013 [J]. *Progress in Oceanography*, 2015, **137**: 446-455.
- [6] González-García C, Forja J, González-Cabrera M C, et al. Annual variations of total and fractionated chlorophyll and phytoplankton groups in the Gulf of Cadiz [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, **613-614**: 1551-1565.
- [7] McKie-Krisberg Z M, Sanders R W. Phagotrophy by the picoeukaryotic green alga *Micromonas*: implications for Arctic Oceans [J]. *The ISME Journal*, 2014, **8**(10): 1953-1961.
- [8] Vault D, Eikrem W, Viprey M, et al. The diversity of small eukaryotic phytoplankton ( $< 3 \mu\text{m}$ ) in marine ecosystems [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, **32**(5): 795-820.
- [9] Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, et al. Determinants of community structure in the global plankton interactome [J]. *Science*, 2015, **348**(6237): 1262073.
- [10] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 2045-2050.
- [11] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity [J]. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 4-18.
- [12] Zimmermann J, Glöckner G, Jahn R, et al. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, **15**(3): 526-542.
- [13] Saunders G W. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea-Neodilsea* complex and *Weeksia* [J]. *Botany*, 2008, **86**(7): 773-789.
- [14] 江雪娇. 北黄海微小型浮游植物的丰度及微小型真核浮游生物分子多样性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.  
Jiang X J. Analysis of picoplankton abundance and study of genetic diversity of microeukaryotes in the north Yellow Sea [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [15] 屈侃. 南黄海微小型浮游生物时空分布及主要影响因素研究——基于流式细胞技术 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Qu P. The distribution of picoplankton communities in the southern Yellow Sea—The investigation basing on flow cytometry [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [16] 吕未晓, 栾青杉, 彭亮, 等. 2014 年夏黄海浮游植物群落及其对物理过程的响应 [J]. *海洋科学进展*, 2016, **34**(1): 70-84.  
Lv M X, Luan Q S, Peng L, et al. Assemblages of phytoplankton in the Yellow Sea in response to the physical processes during the summer of 2014 [J]. *Advances in Marine Science*, 2016, **34**(1): 70-84.
- [17] Yuan J, Li M Z, Lin S J. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(7): e0133060.
- [18] Ma Z C, Fu W J, Liu G L, et al. High-level pullulan production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenium* P16 isolated from mangrove system [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, **98**(11): 4865-4873.
- [19] Han Z, Deng M, Yuan A, et al. Vertical variation of a black soil's properties in response to freeze-thaw cycles and its links to shift of microbial community structure [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, **625**: 106-113.
- [20] Amaral-Zettler L A, McCliment E A, Ducklow H W, et al. Correction: a method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes [J]. *PLoS One*, 2009, **4**(7): e6372.
- [21] Bellemain E, Davey M L, Kausrud H, et al. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost [J]. *Environmental Microbiology*, 2013, **15**(4): 1176-1189.
- [22] Liu L M, Yang J, Yu Z, et al. The biogeography of abundant and rare bacterioplankton in the lakes and reservoirs of China [J]. *The ISME Journal*, 2015, **9**: 2068-2077.
- [23] 张宛宛. 基于 DNA 宏条形码技术的浮游植物群落多样性监测研究 [D]. 南京: 南京大学, 2017.  
Zhang W W. Study on biodiversity monitoring of phytoplankton community based on DNA barcoding technology [D]. Nanjing: Nanjing University, 2017.
- [24] Piredda R, Tomasino M P, D'Erchia A M, et al. Diversity and temporal patterns of planktonic protist assemblages at a Mediterranean Long Term Ecological Research site [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, **93**(1): fiw200.
- [25] 王靖淇, 王书平, 张远, 等. 高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征 [J]. *环境科学*, 2017, **38**(4): 1403-1413.  
Wang J Q, Wang S P, Zhang Y, et al. Community structure characteristics of eukaryotic planktonic algae in Liaohe River through high-throughput sequencing [J]. *Environmental Science*, 2017, **38**(4): 1403-1413.
- [26] 郑白雯. 北部湾北部浮游生物生态学研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.  
Zheng B W. Ecological studies on plankton in northern Beibu Gulf [D]. Xiamen: Xiamen University, 2014.
- [27] 叶然, 刘莲, 王琼, 等. 春季浙北海域浮游植物群落的空间分布 [J]. *中国环境科学*, 2017, **37**(4): 1492-1504.  
Ye R, Liu L, Wang Q, et al. Biogeography of spring phytoplankton community in the coastal waters of northern Zhejiang [J]. *China Environmental Science*, 2017, **37**(4): 1492-1504.
- [28] 刘录三, 李子成, 周娟, 等. 长江口及其邻近海域赤潮时空分布研究 [J]. *环境科学*, 2011, **32**(9): 2497-2504.  
Liu L S, Li Z C, Zhou J, et al. Temporal and spatial distribution



- of red tide in Yangtze River Estuary and adjacent waters [J]. *Environmental Science*, 2011, **32**(9): 2497-2504.
- [29] 叶然, 刘艳云, 崔永平, 等. 东海营养盐结构的时空分布及其对浮游植物的限制[J]. *海洋与湖沼*, 2015, **46**(2): 311-320.  
Ye R, Liu Y Y, Cui Y P, *et al.* Temporal and spatial distributions of nutrient structure and limitation on phytoplankton in the East China Sea [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, **46**(2): 311-320.
- [30] 苏纪兰, 黄大吉. 黄海冷水团的环流结构[J]. *海洋与湖沼增刊*, 1995, **26**(5): 1-7.  
Su J L, Huang D J. On the current field associated with the Yellow Sea Cold Water Mass [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica Supplement*, 1995, **26**(5): 1-7.
- [31] Etheridge S M, Roesler C S. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2005, **52**(19-21): 2491-2500.
- [32] Pilkaitytė R, Schoor A, Schubert H. Response of phytoplankton communities to salinity changes—a mesocosm approach [J]. *Hydrobiologia*, 2004, **513**(1-3): 27-38.
- [33] 朱明, 张学成, 茅云翔, 等. 温度、盐度及光照强度对海链藻(*Thalassiosira* sp.) 生长的影响[J]. *海洋科学*, 2003, **27**(12): 58-61.  
Zhu M, Zhang X C, Mao Y X, *et al.* Effect of temperature, salinity and illumination on the growth of *Thalassiosira* sp. [J]. *Marine Sciences*, 2003, **27**(12): 58-61.
- [34] 张莉, 林佳宁, 张远, 等. ITS 高通量测序研究黄海微型真核浮游生物多样性及分布特征[J]. *环境科学*, 2018, **39**(5): 2368-2379.  
Zhang L, Lin J N, Zhang Y, *et al.* Eukaryotic micro-plankton community diversity and characteristics of regional distribution in the Yellow Sea by ITS high-throughput sequencing [J]. *Environmental Science*, 2018, **39**(5): 2368-2379.