

采水量对寡营养海域浮游真核微生物分子多样性评价的影响

赵荣杰^{1,2}, 赵峰^{1,2,3}, 徐奎栋^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 真核微生物是海洋生态系统中生物多样性高且功能重要的组成部分, 但因个体微小且形态特征不明显, 传统的分类学方法很难全面评估其多样性。环境 DNA 结合高通量测序技术为真核微生物多样性研究提供了可靠技术支持, 然而采水量对于评估寡营养海域浮游真核微生物多样性的影响仍知之甚少。本研究在吕宋海峡及菲律宾海盆中设置 5 个采样点, 每个站点各取 4 个 10 L 表层海水样品用于真核微生物高通量测序分析。对各站每个重复所获得的真核微生物多样性进行研究, 并分析了采水量与真核微生物 OTU 数量、群落结构及优势种和稀有种之间的关系。研究发现, 采水量和真核微生物 OTU 数量之间呈正相关关系, 10 L 水所获得的平均 OTU 数量为 40 L 水的 64%, 20 L 水可获得 82%, 30 L 水为 92%。10 L 样品所获得的群落多样性指数显著低于 30 L 和 40 L 样品检获的群落, 而 20 L 样品与 30 L 和 40 L 样品在多样性指数上无显著差异。随着采水量增加, 更多的稀有 OTUs 被检获, 而丰富 OTUs 数量变化不明显。但统计分析显示, 10 L 与 40 L 组样品检获的真核微生物群落结构无显著差异。因此, 综合考虑样品的可得性和现场处理时间, 最低 20 L 的采水量可用于评估这一寡营养海域的真核微生物多样性和群落结构特点。

关键词: 真核微生物; 分子多样性; 采水量; 寡营养海域

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)09-0001-08

DOI: 10.11759/hyqx20200212001

真核微生物狭义上指原生生物, 广义上还包括单细胞真菌和微型后生动物^[1-3], 其种类繁多、分布广泛, 在海洋初级生产、微食物网和生物地球化学循环等生态过程中发挥着重要作用^[4-5]。海洋真核微生物多样性的研究对于理解海洋生态环境的变化过程以及人类活动和气候变化对海洋生态系统的影响等至关重要。

近年来, 环境 DNA 结合高通量测序技术被广泛应用于真核微生物多样性研究中^[6-8], 极大地拓展了对真核微生物多样性及其分布的认知, 检获了大量潜在新类群, 并为微型生物地理分布这一国际热点争论, 提供了大量新鲜素材和佐证^[9-14]。近海因陆源输入^[15-17]等原因具有丰富的营养盐, 真核微生物丰度和生物量较高, 已有的关于近海水体中的真核微生物多样性研究中, 采样量为 300 mL~40 L 不等^[9, 12, 18-19]。热带大洋多为寡营养环境, 真核微生物的丰度和生物量明显较近海低, 检获足够的生物多样性所需要的采样量远大于近海。受限于采样方法、采样时间和成本, 大洋生物调查的采样量差异巨大, 范围为 10~500 L^[6, 11, 13]。

采样量是影响海洋真核微生物多样性评估的重要因素。有关采样量对真核微生物多样性影响的研究多集中于沉积物。Fonseca 等人^[20]关于海底沉积物中后生动物多样性的研究发现, 8 个采样站共 24 个沉积物样品所获得的 OCTU(Operational Clustering of Taxonomic units, 可操作聚类分类单元)稀释曲线未达到饱和。由于底栖生物斑块分布的特性, 即使高通量测序技术佐以大量的样品, 真实的物种多样性仍未可知。水体与沉积物不同, 潮汐和洋流等海洋现象增强了水体的连通性, 不同海域之间或不同深度水层之间得以产生化学和生物因素的交流^[21], 从而使得水体中真核微生物的分布均匀度指数高于底栖群

收稿日期: 2020-02-12; 修回日期: 2020-03-16

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1400505, 2017YFC1403401); 国家自然科学基金资助项目(41976099, 41930533); 全球变化与海气相互作用专项(GASI-02-PAC-ST-Wwin)

[Foundation: The National Key Research and Development Plan, No. 2016YFC1400505, No. 2017YFC1403401; The China Natural Science Foundation, No. 41976099, No. 41930533; The Global Climate Changes and Air-sea Interaction Program, No. GASI-02-PAC-ST-Wwin]

作者简介: 赵荣杰(1995-), 女, 山东德州人, 博士研究生, 主要从事海洋真核微生物多样性研究, E-mail: zrzjmail@126.com; 徐奎栋, 通信作者, 研究员, E-mail: kxu@qdio.ac.cn。

落,但水体中真核微生物多样性仍与采样量存在正相关的关系。因此,探究水体采样量对检获的真核微生物多样性的影响,对真核微生物多样性研究具有重要的指导意义。

吕宋海峡北起台湾岛南至菲律宾吕宋岛,是连接中国南海和西太平洋的重要通道^[22]。吕宋海峡属于寡营养海域,作为黑潮在沿太平洋西岸北上及进入南海的过程中的必经之地,其水文环境和生物多样性深受黑潮携带的西太平洋海流信号的影响^[23-26]。该海区真核微生物群落交流密切,且处于大洋与近岸的交汇区,基于该海区的研究,对未来近岸和远洋的真核微生物多样性分布研究均具有重要的参考价值。

本研究旨在探究不同采样量对水体中真核微生物多样性评估的影响,回答水体中真核微生物多样性是否随采样量的增加而增加,多大采样量能够充分反映水体中的真核微生物群落结构与多样性分布特点等科学问题。

1 材料与方法

1.1 采样点的选择和样品的采集

实验所用样品系 2018 年 6 月搭载“华务号”科考船,于吕宋海峡处获取,共计 5 个采样点,其中 C08(124°E, 22.333°N)、C10(122.667°E, 21.667°N)和 C12(124°E, 21.667°N)站位位于吕宋海峡东侧,处于菲律宾海盆中; C14(120.5°E, 21°N)和 C19(120.5°E, 19.6°N)站位位于吕宋海峡及其西侧,处于南海(图 1)。

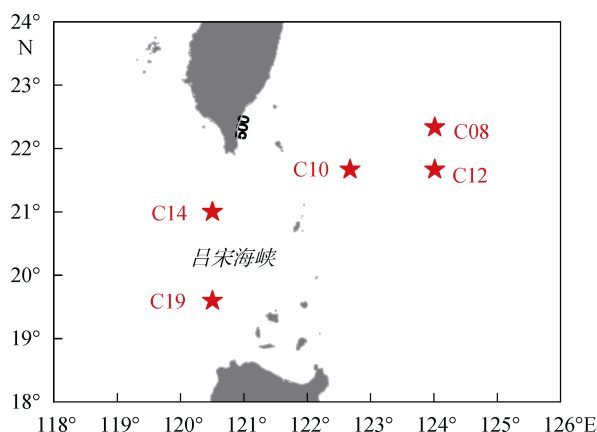


图 1 采样站位图

Fig. 1 Map of sampling sites

每个采样点设 4 个重复,每个重复采 10 L 表层海水。海水预先用孔径为 200 μm 的筛绢过滤,再用孔径为 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜过滤,将滤膜保存于

无 RNA 酶的 2 mL 冻存管,并立即放置到液氮中保存,带回实验室后转移至 -80°C 冰箱保存。采水及过滤所用的水桶、筛绢、塑料管等在每次使用后均用无菌蒸馏水冲洗 2~3 遍,排除样品之间的交叉污染。

1.2 DNA 的提取和真核微生物 18S rDNA 的扩增

所有样品均采用凯杰 DNA/RNA 提取试剂盒 (AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Qiagen, Germany)并按照使用说明进行 DNA 的提取。最终每个样品得到 1 份 DNA(100 μL)。以 DNA 为模板利用真核生物特异性引物 F (5'-CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3', 565bp-584bp) 和 R (5'-ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A-3', 964bp-981bp)对样品进行 18S V4 区的扩增,扩增程序见文献^[27],每份 DNA 设置 3 个重复。为减少 PCR 过程中产生的误差,采用高保真酶 Q5(BioLabs INC., NEW ENGLAND)进行扩增。扩增产物采用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行浓度及扩增片段准确度的检测,对在 480bp 处有明显亮带的样品采用 Qubit 2.0 荧光定量仪(Thermo Scientific)测定准确浓度,并用 GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA)进行纯化,3 个重复进行合样,用于后续测序。

1.3 高通量测序与数据处理

扩增样品由北京诺禾致源科技股份有限公司利用 Illumina HiSeq 测序平台进行测序,并采用 NEB Next Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA) 建立样品序列库,添加 barcode 序列。序列库的质量通过 Qubit 2.0 荧光定量仪 (Thermo Scientific, USA) 和 Agilent Bioanalyzer 2100 system 进行测定。

对 Illumina HiSeq 测序平台得到的序列信息进行拼接得到原始数据(Raw Data),经过质控和去嵌合体得到可用于后续分析的有效数据(Clean Data)。利用 USEARCH(version9.2/10.0<http://drive5.com/uparse/>)对有效数据进行去冗余、去单一序列和 97%相似度的 OTU(Operational Taxonomic Units, 可操作分类单元)聚类分析,根据 OTU 聚类结果,对每个 OTU 的代表序列与 SILVA 数据库比对作物种注释,得到对应的物种信息和基于物种的丰度分布情况,即 OTU Distribution Table(以下简称 OTU Table)。

利用 EstimateS (EstimateS 9.1)对 OTU Table 中各 OTU 丰度信息进行 4 次随机重抽样,重抽样标准为 10 000 条序列,得到各站位在 10 L、20 L、30 L

和 40 L 时的 OTU 数目和 ACE 指数, 并以此为基础在 Excel 中绘制物种累积曲线、在 SPSS 中利用 ANOVA 功能计算各组之间的单因素方差值。

以各个站位 4 个重复的 OTU 丰度信息为基础利用 R 语言的 VEGAN 包的 `vegdist` 功能(<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>)计算各个站位 4 个重复和重复总和之间的 Bray-Curtis 距离, 并以此为基础利用 R 语言的 `ggplot2` 包(<https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>)作物种组成和物种丰度的主坐标分析(PCoA, Principal Co-ordinates Analysis)。

2 结果

2.1 物种丰富度与采样量的关系

自 5 个站位共计 20 个样品的分析中获得 2 066 528 条有效序列, 97% 相似度聚类后得到 2 737 个 OTU。5 个站位真核微生物的 OTU 数量与采样量之间均存在正相关关系, 且每个站位的物种累积曲线均未达到饱和。分析发现, 假设各站位 40 L 水所获得的 OTU 数量为 100%, 则 10 L 水所获得的平均 OTU 数量为 64.1%, 20 L 水为 81.7%, 而 30 L 水为 92.3%(图 2, 表 1)。采样量越大, 可能获得的 OTU 数量就越多。

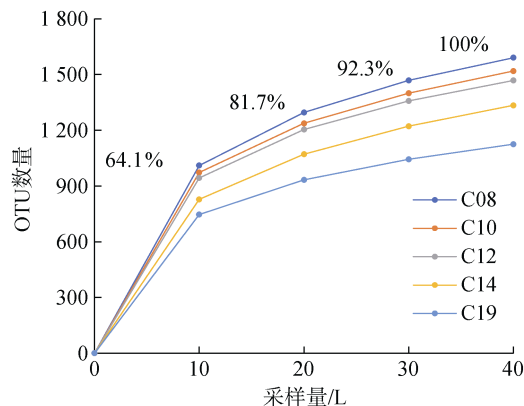


图 2 各站位真核微生物物种累积曲线

Fig. 2 The accumulation curve of microeukaryotes collected from each station

所有站位不同采样量下所获的 OTU 数量的单因素方差分析(one-way ANOVA, 方差齐性检验 $P=0.108$, 符合正态分布)显示, 采样量对 OTU 数量存在显著影响。10 L 水所获得的 OTU 数量显著少于其他各组($P=0.00\sim 0.02$); 20 L 水所获得的 OTU 数量显著少于 40 L 水组($P=0.017$), 但与 30 L 组没有显著差异; 30 L 组与 40 L 组没有显著差异, 采样量对 OTU 数量存在显著影响。

表 1 各站位 10 L、20 L 及 30 L 水的 OTU 数量占 40 L 水 OTU 数量的百分比/%

Tab. 1 Percentage of OTU number obtained from 10 L, 20 L, and 30 L seawater samples in that obtained from 40 L seawater samples

采样量/L	C08	C10	C12	C14	C19	平均值±标准差
10	63.5	64.0	64.2	62.1	66.4	64.1±1.5
20	81.5	81.5	82.0	80.3	82.9	81.7±0.9
30	92.3	92.1	92.5	91.6	92.8	92.3±0.4
40	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0±0.0

所有站位的不同采样量下的 ACE 指数的单因素方差分析(方差齐性检验 $P=0.930$, 符合正态分布)显示, 采样量对 ACE 指数存在显著影响(表 2)。10 L 组的 ACE 指数显著少于 30 L 和 40 L 组($P=0.001\sim 0.006$); 20 L 组的 ACE 指数与 30 L、40 L 组没有显著差异; 30 L 组与 40 L 组没有显著差异, 采样量对 ACE 指数存在显著影响。

表 2 各站位 10 L、20 L、30 L 及 40 L 水的 ACE 指数
Tab. 2 ACE index based on the sample sizes of 10 L, 20 L, 30 L, and 40 L seawater samples

采样量/L	C08	C10	C12	C14	C19	平均值±标准差
10	1 337	1 194	1 236	1 080	939	1 157±153
20	1 606	1 452	1 481	1 301	1 130	1 394±183
30	1 768	1 596	1 621	1 450	1 227	1 532±204
40	1 871	1 701	1 727	1 570	1 308	1 635±212

2.2 群落结构与采样量的关系

对每个站位 4 个重复(即 4 个 10 L 组)和重复相加得到的总和(即 40 L 组)的真核微生物群落结构进行比较, 以 Bray-Curtis 距离为基础的主坐标分析(PCoA)显示, 10 L 组与 40 L 组之间在物种组成上重合度很高, 无明显差异(图 3)。多元方差分析(Adonis)显示, 4 个 10 L 组与 40 L 组之间的群落差异 P 值均大于 0.05, 不存在显著差异。

在 5 个站位的样品中, OTUs 主要包括甲藻(Dinophyta)、纤毛虫(Ciliophora)、不等鞭毛类(Stramenopiles)、有孔虫类(Rhizaria)、Hacrobia(包括隐藻类 Cryptophyta 和定鞭藻类 Haptophyta)、后鞭毛类(Opisthokonta)和原始色素体类(Archaeplastida)等主要类群以及其他丰度较低的 OTUs(图 4, 图 5), 其中 Dinophyta 和 Ciliophora 同属于囊泡类(Alveolata)。

Alveolata、Stramenopiles 和 Rhizaria(SAR 类群)为主要类群, 在所有样品中的平均 OTU 数量依次占总数

量的 63.3%、10.8%和 10.0%, 平均序列数依次占总数量的 70%、4.0%和 11.4%。

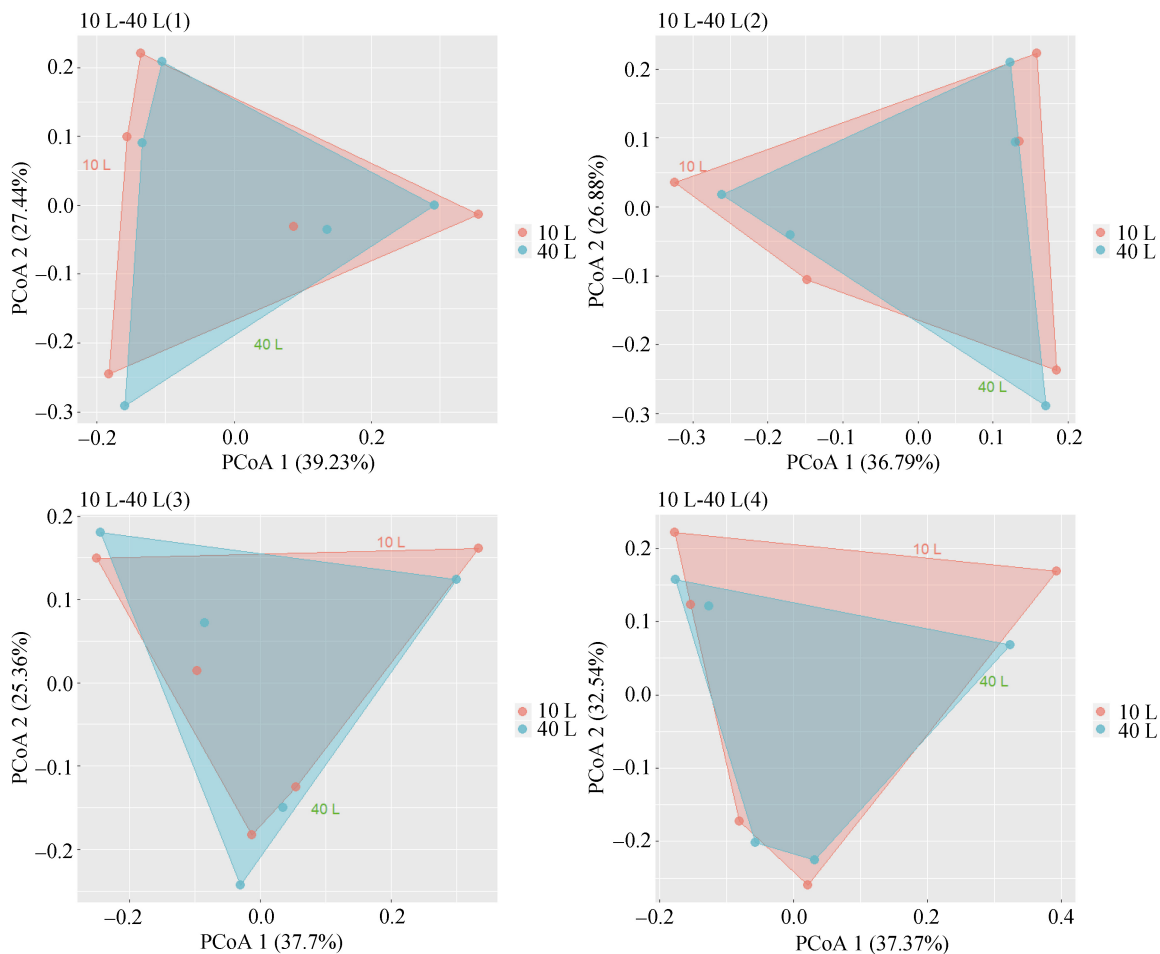


图 3 四个 10 L 重复和 40 L 之间的群落相似性

Fig. 3 Similarities between communities obtained from the 40 L seawater and each of 10 L seawater samples

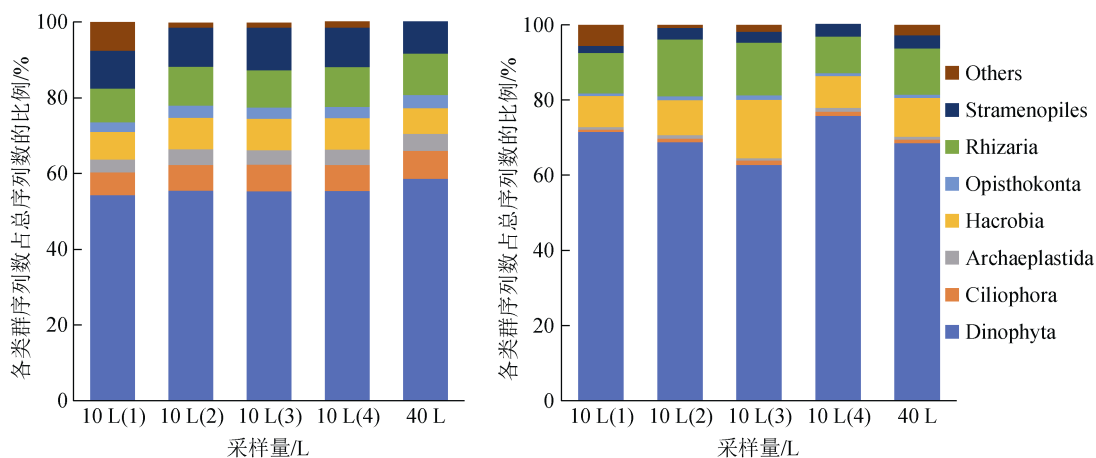


图 4 所有站点主要类群的相对丰度

Fig. 4 The proportions of the OTUs and sequences of major taxonomic groups

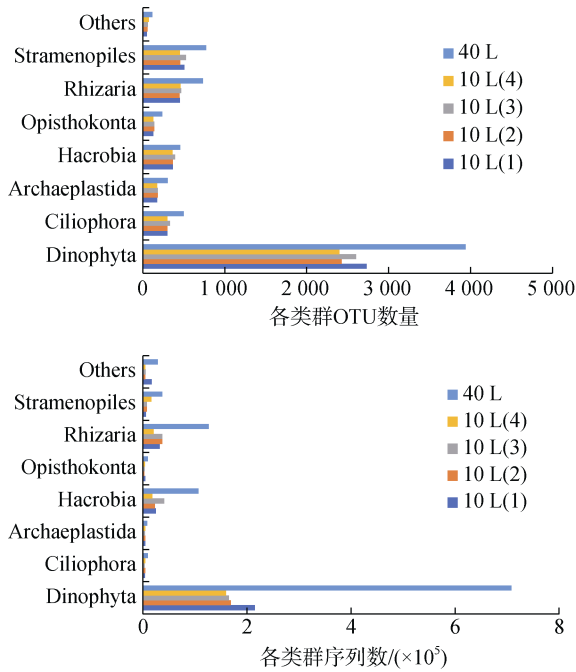


图 5 所有站点主要类群的丰度

Fig. 5 Number of OTUs and sequences of major taxonomic groups

表 3 优势 OTU 和稀有 OTU 数量和数量占比

Tab. 3 Number and proportion of abundant and rare OTUs among the total OTUs

		重复 1(10 L)	重复 2(10 L)	重复 3(10 L)	重复 4(10 L)	总和(40 L)
数量	优势 OTU	13	14.4	14	14	15.4
	稀有 OTU	849.6	774	841.6	773.2	1 310.2
数量占比	优势 OTU	0.014	0.017	0.016	0.016	0.011
	稀有 OTU	0.909	0.891	0.899	0.899	0.933

表 4 OTU 及其对应真核微生物类群(属水平)粒径

Tab. 4 Body sizes of each OTU based on the best BLAST hit at the genus level

OTU	粒径/ μm	代表属
OTU31	1.5~3	<i>Pelagomonas</i>
OTU23	4~7	<i>Caecitellus</i>
OTU19	6~26	<i>Chrysochromulina</i>
OTU13	20~40	<i>Pseudocohnilembus</i>
OTU99	40~80	<i>Akashiwo</i>
OTU3	50~125	<i>Gyrodinium</i>

在不同重复和重复总和中均有分布且数量无明显变化(图 6), 未检测到采样量对不同个体大小的 OTU 丰度的影响。

3 讨论

关于采样量影响微生物多样性的研究多集中于异质化明显的海底沉积物^[28-29], 研究发现, 采样量

2.3 优势种和稀有种与采样量的关系

序列数占该样品总序列数 1%及以上的 OTU 被划为优势 OTU, 序列数占该样品总序列数 0.1%及以下的 OTU 被划为稀有 OTU。

在数量上, 优势 OTU 数量随采样量的增加无明显变化, 稀有 OTU 的数量随采样量的增加而增加(表 3)。在数量占比上, 总和(40 L)中优势 OTU 占 OTU 总数目的比值小于各个重复(10 L), 且优势 OTU 占 OTU 总数目的比值在各站点不同重复之间无显著差异, 在各个重复与总和之间存在显著差异($P=0.01\sim 0.04$); 总和中稀有 OTU 占 OTU 总数目的比值大于各个重复, 且稀有 OTU 占 OTU 总数目的比值在同一站点不同重复之间无显著差异, 但不同重复与总和之间均有显著差异($P=0.00\sim 0.02$)。

2.4 采样量对不同粒级生物多样性的影响

选取鉴定到种且匹配度为 100% 的 OTUs, 根据对应物种的个体大小对其分组(表 4)。分析各组丰度与采样量之间的关系, 发现不同个体大小的 OTU

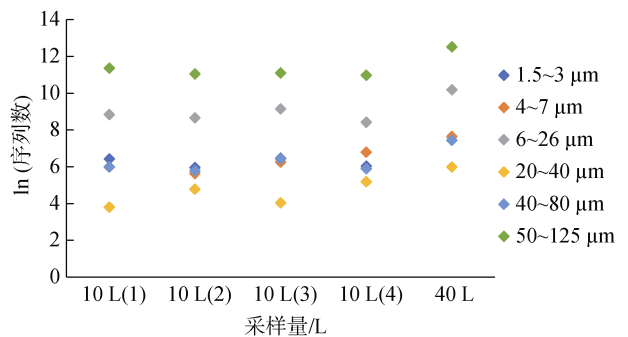


图 6 四个 10 L 重复和 40 L 不同粒级生物序列数

Fig. 6 Sequence number of taxa with different body sizes obtained from the 40 L seawater and each of the 10 L seawater samples

对沉积物中的细菌、真菌以及小型底栖动物的多样性和群落组成有显著影响^[30-32]。在 Nascimento 等人的研究中, 随着采样量的增加, 原生生物的群落组成趋于稳定, 表明在评估沉积物中的生物 β -多样性

时, 采样量是关键影响因素^[28]。

与沉积物不同, 关于采样量对异质性低的水体中真核微生物的影响的研究较少。已有的海洋水体真核微生物多样性研究中, 近岸站位的采样量多至 40 L^[19], 少则 300 mL^[9], 这与采样地水体浑浊度和真核微生物丰度有关^[33]。通常情况下, 采样量越大, 可能获得的真核微生物物种越多。本研究发现, 随着采样量增加, 吕宋海峡水体中的真核微生物 OTU 数量和 ACE 指数显著增加, 但当采样量达到 20 L 时, ACE 指数与采样量之间不再存在显著相关性, 20 L 组的 OTU 数量与 30 L 组也无显著差异, 而且随采样量增加, 主要类群的种类和相对丰富度比例即真核微生物群落结构并无显著变化。

除了考虑采样量的大小, 野外采样时还需考虑采样时间对样品质量的影响。当采样地水体较混浊时, 滤膜易被堵塞, 将极大地延长过滤时间。而一旦过滤时间过长, 会造成水体中 DNA 和 RNA 的过多降解, 因此, 野外采样过滤时间一般控制在 30 分钟之内^[34]。在实际采样过程中, 应同时考虑样品过滤时间, 根据采样地水体的浑浊程度和真核微生物丰度确定合适的采样量。

在本研究中, 各站位不同重复的丰富 OTU 数量稳定, 各重复中丰富 OTU 数目占全部数目的比例随采样量的增加而降低, 而稀有种 OTU 数占全部 OTU 数量的比例随着采样量增加而增加, 表明优势种更易检获, 小采样量时已基本检获了全部的优势种, 随着采样量增加, 更多的稀有种被检获。微生物群落一般由少数优势种和大量稀有种构成^[19], 稀有种因其庞大的数量和高度的多样性很难被全部检测到^[35]。

与传统分类学方法相比, 高通量测序能够高效地获取环境中的微生物多样性, 可检测到因丰度较小而难以观察到的稀有种^[36]。鉴于其高度的灵敏性, PCR 过程和数据处理的细微差别能够造成截然不同的分类结果, 因此, 在评估样品的真核微生物多样性时, 选择一个可信的实验流程和分类标准尤为重要^[20]。首先, 本研究选用的扩增引物为真核生物通用引物, 扩增区域为编码真核生物核糖体小亚基 RNA V4 区的 DNA, 该区域较为保守, 能够保证属级水平的精确鉴定^[27]。其次, 为了获得更全面的真核微生物物种信息, 每个重复样品设置三个 PCR 重复, 扩增完成后合并 PCR 产物并送测。在后期数据处理时, 选择 97% 相似度聚类^[37], 以保证获得真实物种信息, 同时减少因更高相似度产生的单一序列比例, 由此

提高了分类效率。

4 总结

增加采水量可检获更多的 OTU, 但当采水量达到 20 L 时, OTUs 增加的速率减缓, 与更大体积水样检获的群落多样性指数无显著差异。随着采水量增加, 更多的稀有 OTUs 被检获, 而丰富的 OTUs 数量变化不显著, 采水量对真核微生物群落结构没有显著影响。综合考虑样品的可得性和现场处理时间的影响, 采集 20 L 水所获得的物种丰富度和群落构成可基本反映这一寡营养海域的真核微生物多样性。

致谢: 中国科学院海洋研究所南峰、任强和黄平平协助样品采集, 谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Bik H M, Sung W, De Ley P, et al. Metagenetic community analysis of microbial eukaryotes illuminates biogeographic patterns in deep-sea and shallow water sediments[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(5): 1048-1059.
 - [2] McGrath C L, Katz L A. Genome diversity in microbial eukaryotes[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2004, 19(1): 32-38.
 - [3] Murray S A, Patterson D J, Thessen A E. Transcriptomics and microbial eukaryote diversity: a way forward[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, 27(12): 651-652.
 - [4] Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 782-791.
 - [5] Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles[J]. *Science*, 2008, 320(5879): 1034-1039.
 - [6] Pernice M C, Giner C R, Logares R, et al. Large variability of bathypelagic microbial eukaryotic communities across the world's oceans[J]. *ISME Journal*, 2016, 10(4): 945-958.
 - [7] Liu L, Liu M, Wilkinson D M, et al. DNA metabarcoding reveals that 200- μ m-size-fractionated filtering is unable to discriminate between planktonic microbial and large eukaryotes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(5): 991-1002.
 - [8] Gong J, Shi F, Ma B, et al. Depth shapes alpha- and beta-diversities of microbial eukaryotes in surficial sediments of coastal ecosystems[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3722-3737.
 - [9] 李桂豪. 黄渤海表层水浮游细菌与真核微生物群落组成和时空分布研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2018.
- Li Guihao. Community composition and spatio-temporal

- distribution of bacterioplankton and microbial eukaryotes in the surface waters of the Bohai Sea and the Yellow Sea[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2018.
- [10] Rey A, Carney K J, Quinones L E, et al. Environmental DNA metabarcoding: A promising tool for ballast water monitoring[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(20): 11849-11859.
- [11] Wu P F, Li D X, Kong L F, et al. The diversity and biogeography of microeukaryotes in the euphotic zone of the northwestern Pacific Ocean[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 698: 134289.
- [12] Cleary D F R, Gomes N C M. Baseline information on prokaryotic and microeukaryotic plankton communities inside and outside of Indonesian marine lakes[J]. *Journal of Sea Research*, 2019, 148: 23-32.
- [13] Zhou J, Song X, Zhang C Y, et al. Distribution patterns of microbial community structure along a 7000-mile latitudinal transect from the Mediterranean Sea across the Atlantic Ocean to the Brazilian coastal sea[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76(3): 592-609.
- [14] Zhao F, Xu K D. Molecular diversity and distribution pattern of ciliates in sediments from deep-sea hydrothermal vents in the Okinawa Trough and adjacent sea areas[J]. *Deep-Sea Research Part I – Oceanographic Research Papers*, 2016, 116: 22-32.
- [15] 张海波, 裴绍峰, 祝雅轩, 等. 初夏渤海湾营养盐结构特征及其限制状况分析[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(9): 3524-3530.
Zhang Haibo, Pei Shaofeng, Zhu Yaxuan, et al. Nutrient structure and nutrient limitation for phytoplankton growth in Bohai bay in the early summer[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(9): 3524-3530.
- [16] 姜会超, 王玉珏, 李佳蕙, 等. 莱州湾营养盐空间分布特征及年际变化趋势[J]. *海洋通报*, 2018, 37(4): 411-423.
Jiang Huichao, Wang Yuyu, Li Jiahui, et al. Annual variation and spatial distribution of nutrients in the Laizhou Bay[J]. *Marine Science Bulletin*, 2018, 37(4): 411-423.
- [17] De Jonge C, Talbot H M, Bischoff J, et al. Bacterioplanepolyol distribution in Yenisei River and Kara Sea suspended particulate matter and sediments traces terrigenous organic matter input[J]. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2016, 174: 85-101.
- [18] Massana R, Gobet A, Audic S, et al. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 4035-4049.
- [19] Logares R, Audic S, Bass D, et al. Patterns of rare and abundant marine microbial eukaryotes[J]. *Current Biology*, 2014, 24(8): 813-821.
- [20] Fonseca V G, Carvalho G R, Sung W, et al. Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 98, doi: 10.1038/ncomms1095.
- [21] Villarino E, Watson J R, Jonsson B, et al. Large-scale ocean connectivity and planktonic body size[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 142.
- [22] 于君. 黑潮入侵对南海初级生产力的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Yu Jun. The influence of Kuroshio intrusion on primary productivity in the South China Sea[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [23] 宋金明, 袁华茂. 黑潮与邻近东海生源要素的交换及其生态环境效应[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(6): 1169-1177.
Song Jinming, Yuan Huamao. Exchange and ecological effects of biogenic elements between Kuroshio and adjacent East China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(6): 1169-1177.
- [24] 王祥鹏, 张玉红, 王爱梅, 等. 南海次表层盐度的低频变化及与太平洋年代际振荡的关系[J]. *热带海洋学报*, 2019, 38(4): 1-9.
Wang Xiangpeng, Zhang Yuhong, Wang Aimei, et al. Low-frequency variability of subsurface salinity in the South China Sea and its relationship with the Pacific Decadal Oscillation[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2019, 38(4): 1-9.
- [25] Zheng Z W, Weng M C, Fang W P. Impacts of the Kuroshio intrusion entering the Luzon Strait on the local atmosphere by satellite observations[Z]. Honolulu: Remote Sensing of the Atmosphere, Clouds, and Precipitation VII, 2018.
- [26] Liu Q, Feng M, Wang D. ENSO-induced interannual variability in the southeastern South China Sea[J]. *Journal of Oceanography*, 2011, 67(1): 127-133.
- [27] Stoeck T, Bass D, Nebel M, et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19: 21-31.
- [28] Nascimento F J A, Lallias D, Bik H M, et al. Sample size effects on the assessment of eukaryotic diversity and community structure in aquatic sediments using high-throughput sequencing[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 1-12.
- [29] Lanzen A, Lekang K, Jonassen I, et al. DNA extraction replicates improve diversity and compositional dissimilarity in metabarcoding of eukaryotes in marine sediments[J]. *Plos One*, 2017, 12(6): e0179443.
- [30] Kang S, Mills A L. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(2): 242-250.
- [31] Ellingsoe P, Johnsen K. Influence of soil sample sizes on the assessment of bacterial community structure[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(11): 1701-1707.
- [32] Brannock P M, Halanych K M. Meiofaunal community

- analysis by high-throughput sequencing: Comparison of extraction, quality filtering, and clustering methods[J]. *Marine Genomics*, 2015, 23: 67-75.
- [33] Edgcomb V, Orsi W, Bunge J, et al. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness[J]. *ISME Journal*, 2011, 5(8): 1344-1356.
- [34] Logares R, Audic S, Santini S, et al. Diversity patterns and activity of uncultured marine heterotrophic flagellates unveiled with pyrosequencing[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(10): 1823-1833.
- [35] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [36] Huse S M, Welch D M, Morrison H G, et al. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(7): 1889-1898.
- [37] Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, et al. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(1): 118-123.

Evaluation of the effects of sample size on estimating the molecular diversity of planktonic microeukaryotes in an oligotrophic oceanic region

ZHAO Rong-jie^{1, 2}, ZHAO Feng^{1, 2, 3}, XU Kui-dong^{1, 2, 3}

(1. Department of Marine Organism Taxonomy&Phylogeny Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Feb. 12, 2020

Key words: microeukaryotes; molecular diversity; sample size; oligotrophic oceanic water

Abstract: With a high morphological and functional diversity, marine microeukaryotes are considered a vital component of marine ecosystems. Because of their small size and indistinct morphological features, it is difficult to evaluate the community diversity of microeukaryotes using conventional taxonomic methods. The combination of high-throughput sequencing with environmental DNA is a reliable method for assessing the molecular diversity of microeukaryotes; however, the effects of sample size on estimating their diversity remain unclear. Here we established five sampling sites in the Luzon Strait and collected four replicates of 10 L of surface water at each site for the 18S rDNA high-throughput sequencing of microeukaryotes. We compared the microeukaryotic OTU number, community structure, abundant OTUs, and rare OTUs among the samples of different sample sizes. The results showed a positive relationship between the OTU number of microeukaryotes and the sample size. The average OTU number of microeukaryotes obtained with 10 L, 20 L, and 30 L seawater samples contributed to approximately 64%, 82%, and 92%, respectively, of that obtained with the 40 L sample. The community diversity index of the 10 L sample was significantly lower than that of the 30 L and 40 L samples, but there was no significant difference among the 20 L, 30 L, and 40 L samples. The number of rare OTUs increased with increasing sample size, whereas no distinct change was observed for abundant OTUs. Statistical analysis showed that there was no significant difference in the composition of microeukaryotic community between the 10 L and 40 L samples. Considering the sample availability and treatment time, a seawater sample of at least 20 L is recommended for estimating the diversity and community structure of microeukaryotes in the oligotrophic sea region.

(本文编辑: 赵卫红)