

近海水体环境 DNA 沉降对沉积物中纤毛虫分子多样性评估的影响*

黄平平^{1,2} 赵峰¹ 徐奎栋^{1,2}

(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 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 在陆架海区沉积物中, DNA 高通量测序技术可检获大量浮游寡毛类和舞毛类等非底栖纤毛虫, 这些源于水体的环境 DNA (eDNA) 如何影响对沉积物中纤毛虫分子多样性的评估, 以及影响程度如何尚不明确。本研究选取了黄海冷水团中的两个站位, 通过提取水体和沉积物中 DNA 和 RNA, 并采用直接提取法和洗脱法提取沉积物 DNA, 结合 DNA 和 cDNA 测序技术, 探讨了水体和沉积物中纤毛虫分子多样性的关系。研究表明, 基于洗脱 DNA 法、直接提取 DNA 法和 cDNA 法获得的沉积物中纤毛虫 OTUs 数分别为 451、312 和 324 个, 其中 211 个 OTUs 同时由三种方法检获; 而 164 个 OTUs 仅通过洗脱 DNA 法检获, 其中 89% 为相对丰度低于 0.1% 的稀有类群。直接提取 DNA 法所获的寡毛类和舞毛类序列数占比达 46%, 而在洗脱 DNA 法和 cDNA 法中占比仅为 12% 和 10%。沉积物中检获的 43%—71% 的舞毛类和寡毛类 OTUs 与浅层水 (<40m) 共有, 仅 19%—29% 与深层水 (>40m) 共有, 且这些共有的 OTUs 可同时在浅层水中检获。本研究发现, 对沉积物中纤毛虫分子多样性评价造成影响的浮游类群主要来自浅层水, 洗脱 DNA 与 cDNA 测序均可显著降低浮游类群 eDNA 的影响。鉴于洗脱 DNA 法较之 cDNA 法操作更简便, 且避免了反转录过程导致的偏差, 因此推荐用于对近海沉积物中纤毛虫等真核微生物的分子多样性研究。

关键词 纤毛虫; 海洋水体; 海洋沉积物; 分子多样性; DNA 高通量测序; cDNA 高通量测序
中图分类号 Q958 **doi:** 10.11693/hyhz20191100235

纤毛虫具有较高的生物多样性, 是微食物网中的重要组成部分, 在海洋生态系统中发挥着重要的生态学功能(Fenchel, 2008; 宋微波等, 2009)。研究者们已采用经典形态学方法开展了多项浅海水体或者沉积物中纤毛虫多样性的研究, 并揭示了浮游与底栖环境具有截然不同的纤毛虫群落构成(Meng *et al.*, 2012; 李洁等, 2016)。海水中, 舞毛亚纲(Choreotrichia, 73.3%)和寡毛亚纲(Oligotrichia, 13.3%)等典型浮游纤毛虫为物种数最高的类群, 且丰度占据绝对优势(Liu *et al.*, 2016); 而沉积物中, 前口纲(Prostomatea, 40%—47%)和裂口纲(Litostomatea, 9%—25%)纤毛虫为最优势类群, 而舞毛和寡毛类群则罕见(Meng *et al.*,

2012; 周百灵等, 2016; Zhou *et al.*, 2016)。但是, 形态学方法本身存在的问题和不足限制了人们对纤毛虫多样性的深入了解, 如: 容易忽视数量少、个体微小且难以培养的类群, 且操作过程复杂, 需要丰富的分类学鉴定经验等(黄平平等, 2017)。

近年来, 基于基因测序的方法, 尤其是 DNA 高通量测序, 可检获较之形态学方法更高的多样性, 极大地扩展了对海洋纤毛虫多样性的认识。Gimmler 等(2016)通过 18S rRNA 基因的高通量测序技术, 在大洋真光层水体中检获了 1274 个纤毛虫的可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 其分子多样性远高于基于形态研究的结果; 类群构成上, 分子手

* 国家自然科学基金项目, 41876171 号, 41476144 号。黄平平, 博士研究生, E-mail: hpp1443461935@163.com
通信作者: 徐奎栋, 博士生导师, 研究员, E-mail: kxu@qdio.ac.cn
收稿日期: 2019-11-29, 收修改稿日期: 2020-01-14

段与形态学手段研究结果类似, 主要隶属于舞毛亚纲和寡毛亚纲。在沉积物中, DNA 高通量测序技术检获了极高的纤毛虫分子多样性, 但是浮游生舞毛亚纲的多样性占比高达 20%, 为多样性最高的类群, 且序列数所占比例最高达 20%, 这与形态学研究结果截然不同(Li *et al.*, 2019)。我们的前期研究也发现类似现象, 浮游生舞毛亚纲和寡毛亚纲纤毛虫的序列在沉积物中占比高达 42%, 而通过形态学手段并未在相同站位的沉积物中检获该类群(黄平等, 2017)。沉积物中不仅包括底栖活动虫体的 DNA, 还富集了来自上层水体中浮游类群的包囊和死亡个体, 以及胞外 DNA 等的 eDNA (Torti *et al.*, 2015)。Corinaldesi 等(2005)研究发现近海沉积物中胞外 DNA 浓度约为胞内 DNA 浓度的 40 倍以上, 将这些胞外 eDNA 包含在内会直接影响沉积物中纤毛虫分子多样性的评价。

较之 DNA, RNA 降解快, 不易在环境中保存, 因此环境 RNA(反转录成 cDNA, complementary DNA), 即 cDNA 测序被应用于活动虫体多样性的研究(Xu *et al.*, 2017)。而且, 我们前期研究发现 cDNA 测序检获的底栖纤毛虫群落结构与形态学结果更为相似(黄平等, 2017)。因此, 基于 cDNA 测序的方法会降低水体纤毛虫对沉积物中纤毛虫分子多样性评价的干扰。

迄今, 研究者们主要针对水体或者沉积物单一生境中的纤毛虫多样性开展了研究, 尚未有工作同时研究相同站点的水体和沉积物中的纤毛虫多样性, 因此, 海水中的 eDNA 如何影响沉积物中纤毛虫分子多样性的评价, 以及影响程度依然不明。

本研究以黄海冷水团内的两个站点(水深约 70m)为研究对象, 同时提取不同水层和沉积物中的 DNA 和 RNA, 其中沉积物中 DNA 提取采用直接提取和洗脱两种方法, 通过核糖体 18S DNA 及其 cDNA V4 区高通量测序获得纤毛虫的分子多样性信息, 探明来源于上层水体纤毛虫的 eDNA 对沉积物中纤毛虫多样性评价的影响, 为陆架海域纤毛虫的分子多样性研究提供可靠的技术体系和理论依据。

1 材料与方法

1.1 调查站位与样品采集

本研究于 2018 年 8 月搭乘“科学 3 号”科学考察船在南黄海冷水团内 Y1 (35°59'56.4"N, 123°0'2.4"E) 和 Y2 (35°59'48.6"N, 123°59'58.8"E)两个站位进行样品采集。

海水样品, 利用温盐深剖面探测系统(SBE911)

的 Rosette 采水器采集: 6 个分层: 表层、10m、20m、30m、50m 和底层(Y1: 69m 和 Y2: 72m), 每个分层各采集 1L 海水(Liu *et al.*, 2017)。根据温度和盐度数据, 两个站位 40m 以深水层处于黄海冷水团(温度<10°C; 盐度>32) (Xin *et al.*, 2015)。海水首先经孔径为 200 μ m 的筛绢预过滤, 去除大型浮游生物和杂质等。然后采用 Masterflex 蠕动泵(美国)过滤海水至直径为 47mm, 孔径为 0.22 μ m 的混合纤维素酯膜上(Millipore, USA), 富集生物。过滤时, 控制蠕动泵的转速和压力, 保证细胞完整性。1L 海水, 包括极少数泥沙含量较高的底层水体, 可在 10 分钟内完成过滤。滤膜置于无 RNA 酶的冻存管中, 于-20°C 冰箱中冷冻保存, 回到实验室转移至-80°C 超低温冰箱中保存。

沉积物, 利用 0.1m² 改进型 Gray-Ohara 箱式采泥器采集。每个站位采集 3 箱未受扰动的沉积物样品: 每箱刮取 0—2cm 表层沉积物约 20g 放入封口袋中, 混匀, 快速置于-20°C 冰箱中冷冻保存, 回到实验室转移至-80°C 超低温冰箱中保存。

1.2 DNA 和 RNA 提取及 PCR 扩增

滤膜 DNA 和 RNA 提取采用 All Prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Germany), 该试剂盒可同时提取滤膜上的 DNA 和 RNA。

沉积物 RNA 提取采用 RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (Qiagen, Germany), 每个站位 3 个样品(三箱泥, 每箱 1 个), 各取 2g 用于 RNA 提取; RNA 洗脱完成后的吸附柱, 继续采用 RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (Qiagen, Germany)洗脱 DNA, 获得沉积物的洗脱 DNA。

沉积物 DNA 提取, 还采用了 PowerSoil DNA Isolation kit (Qiagen, Germany), 每个站位 3 个样品, 各取 3 份 0.3g, 分别进行 DNA 提取, 获得沉积物的提取 DNA。

总 RNA 采用 PrimerScript 1st strand cDNA Synthesis Kit 反转录成 cDNA。每个海水样品各一份 DNA 以及 cDNA, 每个沉积物样品各一份洗脱 DNA、cDNA 以及三份提取 DNA 通过巢式 PCR 对纤毛虫 18S rRNA 基因 V4 区进行特异性扩增(Stock *et al.*, 2013)。首先, 采用纤毛虫特异性引物(CiIF 和 CiRI-III)针对纤毛虫的 18S rRNA 基因进行扩增, 扩增长度约 600bp (Lara *et al.*, 2007), 每个样品的 DNA/cDNA 进行三次重复 PCR。采用 Q5 高保真 DNA 聚合酶(New England Biolabs)进行 PCR 扩增, 第一轮 PCR 反应体系为: 正反向引物各 0.5 μ L, 模板 1.5 μ L, Q5 聚合酶

0.25 μ L, 10mmol/L dNTPs 0.5 μ L, Q5 Reaction Buffer 和 High GC Enhancer 各 5 μ L, 最后加双蒸水补齐 25 μ L。反应流程: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 然后 98 $^{\circ}$ C 变性 45s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 终止于 4 $^{\circ}$ C (Lara *et al.*, 2007)。然后, 以第一轮 PCR 产物为模板, 采用真核特异性引物(EukF 和 EukR) 对 V4 高变区进行特异性扩增, 扩增长度约 400bp (Stoeck *et al.*, 2010)。第二轮 PCR 反应体系为: 正反向引物各 1 μ L, 模板 1.5 μ L, Q5 聚合酶 0.5 μ L, 10mmol/L dNTPs 1 μ L, Q5 Reaction Buffer 和 High GC Enhancer 各 10 μ L, 最后加双蒸水补齐 50 μ L。反应流程: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 然后 98 $^{\circ}$ C 变性 30s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共循环 10 次; 98 $^{\circ}$ C 变性 30s, 49 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共循环 25 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 终止于 4 $^{\circ}$ C (Stoeck *et al.*, 2010)。

1.3 测序及序列数据分析

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量, 若符合要求, 则将来自同一样品的 3 个重复的 DNA/cDNA 的 PCR 产物分别进行合并, 每个水层的 DNA/cDNA 的 PCR 产物各一组(如: Y1 站位 5m 层 DY1.5 和 RY1.5), 每个站位沉积物提取 DNA、洗脱 DNA 和 cDNA 的 PCR 产物各三组(如 Y1 站位提取 DNA: SDY1_1T, SDY1_2T, SDY1_3T; Y1 站位洗脱 DNA: SDY1_1, SDY1_2, SDY1_3; Y1 站位 cDNA: SRY1_1, SRY1_2 和 SRY1_3)。最终共 24 个水体样品(12 个 DNA 和 12 个 cDNA)和 18 个沉积物样品(6 个提取 DNA、6 个洗脱 DNA 和 6 个 cDNA), 进行 Illumina HiSeq 测序。

测序过程如下: 使用 NEB Next[®] Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, USA)试剂盒构建文库, 检测文库, 合格后上机测序。测得的原始序列采用 FLASH V1.2.7 对双端测序序列进行合并, 得到原始 Tags (Raw Tags) (Magoč *et al.*, 2011)。采用 QIIME 对 Raw Tags 进行质量控制和过滤: (1) 质量控制: 将 Raw Tags 从连续低质量值(19)碱基数达到设定长度(默认长度值为 3)的第一个低质量碱基位点截断; (2) 长度过滤: 经截取后得到的 Tags 数据集, 进一步过滤掉其中连续高质量碱基长度低于 Tags 长度 75%的 Tags (Caporaso *et al.*, 2010)。进一步采用 UCHIME 去除嵌合体序列, 最终获得有效序列(Edgar *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2011)。采用 USEARCH 对有效序列进一步处理。流程如下: 去冗余; 去噪; 以 97% 水平进行 OTU 聚类。对获得的 OTU 代表序列与 Silva

数据库(v. 123)进行 BLAST 比对, 获得相应序列的分类信息。其中纤毛虫的相对丰度以每个类群的序列数占总序列数的比例(序列数百分比)表示; 丰富度以每个类群的 OTUs 数表示; 相对丰富度以每个类群的 OTUs 数占总 OTUs 数的比例(OTUs 数百分比)表示。

1.4 数据统计分析

稀释性曲线用于评估测序样本的饱和程度。为确保样品间的可比性, 根据单个样本纤毛虫最低序列数进行标准化($n=6683$, DY2.30)。稀释性曲线的绘制, 采用 R 语言(R3.4.3)中的“fossil”和“vegan”包。序列数的标准化处理, 采用 USEARCH v10。使用 Venny2.1 绘制韦恩图。使用 PRIMER v6 软件包中的 CLUSTER 分析不同水层环境因子(温度和盐度), 沉积物和水体样品中纤毛虫的群落结构, 分析之前原始数据进行 $\log(x+1)$ 转化; 环境因子的 CLUSTER 分析基于欧式距离(Euclidean Distance)矩阵, 生物样本的 CLUSTER 分析基于 Bray-Curtis 矩阵。SIMPROF ($P<0.05$)和 ANOSIM 用于分析群落结构差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 环境因子

海水温度和盐度的垂直变化趋势相反, 随着水层加深, 温度降低, 而盐度增加。在 40m 以浅水域, 温度为 16.9—27.7 $^{\circ}$ C, 盐度为 30.5—32.0; 在 40m 以深水, 温度为 7.4—8.8 $^{\circ}$ C, 盐度均约为 32.5。以每个分层温度和盐度进行聚类, 结果显示: 12 个样本聚为两大支, 40m 以深和以浅样本分别聚为一支, ANOSIM 分析两组之间环境因子差异显著($R=0.85$, $P=0.002$), 但各组内部差异不显著(SIMPROF: $P>0.05$) (图 1)。

2.2 基本测序数据

42 个测序样本共获取 1160205 条纤毛虫的序列, 每个样本平均序列数为 27624。其中, DY2.30 序列数最低, 为 6683 条; SRY2_1 序列数最高, 为 77604 条。稀释性曲线显示: 除 SRY1_3 样本外, 其他所有样本测序深度趋于饱和; 较之海水样本, 沉积物样本饱和性较低(图 2)。为确保样品间的可比性, 以下分析均基于标准化后的数据($n=6683$), 标准化之后, 以 97% 的相似性进行聚类, 所有样本共检获 651 个纤毛虫的 OTUs。DY2.72 的 OTUs 数最低, 为 41 个; SDY1_3 的 OTUs 数最高, 为 302 个。

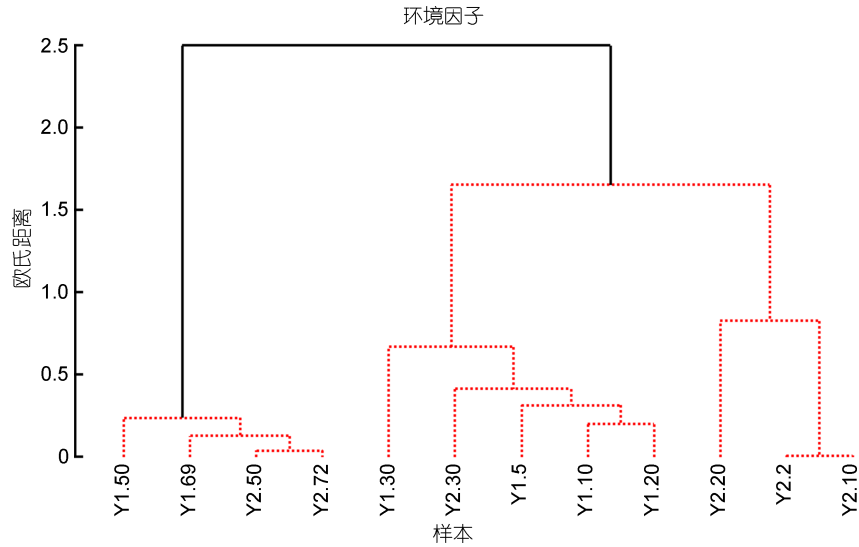


图 1 每个水层环境因子聚类分析(红色显示差异不显著: $P > 0.05$)

Fig.1 UPGMA clustering analysis based on the environmental factors in each layer (the groups with no significant difference are shown by red bars)

注: Y1.5—Y1.69: Y1 站位 5m 层至 Y1 站位 69m 层, Y2.2—Y2.72: Y2 站位 2m 层至 Y2 站位 72m 层

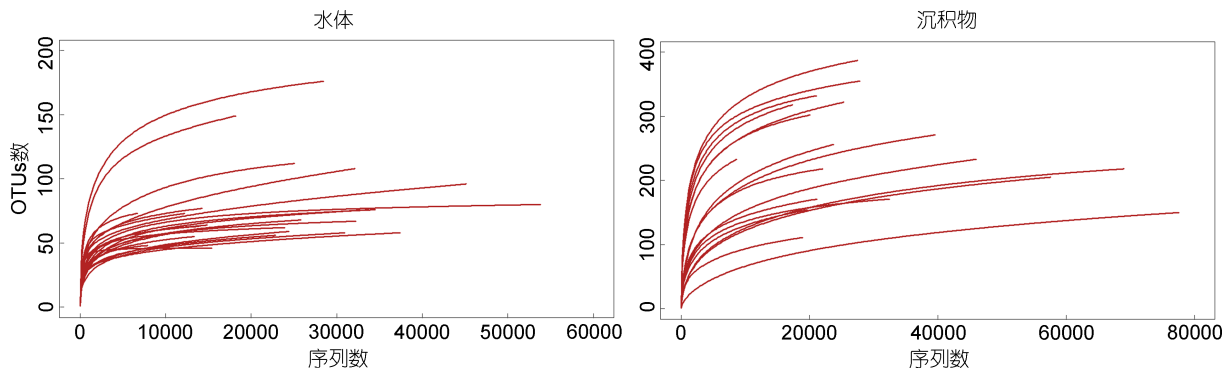


图 2 水体和沉积物中纤毛虫 DNA 和 cDNA 测序样本稀释性曲线

Fig.2 Rarefaction analyses of all DNA and cDNA sequencing samples of ciliates in waters and sediments

2.3 基于 DNA 和 cDNA 测序的水体中纤毛虫多样性和群落结构

在水体中, 两种方法检获的纤毛虫 OTUs 数相似。DNA 和 cDNA 测序分别获得 201 和 218 个 OTUs, 182 个 OTUs 同时通过两种方法检获, 共有 OTUs 序列数分别占总序列数的 99.9% 和 99.4% (图 3a)。两种方法均显示, 较之 40m 以深, 40m 以浅水层中纤毛虫 OTUs 数较高 (图 3b, 3c)。DNA 测序在 40m 以浅和以深中分别获得 165 和 82 个 OTUs, 其中 46 个 OTUs 可以同时在 40m 以浅和以深中检获 (图 3b)。cDNA 测序在 40m 以浅和以深中分别获得 196 和 85 个 OTUs, 其中 63 个 OTUs 可以同时在 40m 以浅和以深中检获 (图 3c)。

与基于环境因子的聚类分析结果一致, 基于 24

个水体纤毛虫测序样本的聚类分析结果显示, 24 个样本亦分为两大组, 40m 以浅和以深分别聚为一组 (ANOSIM: $R=0.994$, $P=0.001$)。SIMPROF 分析结果显示, 除 Y2 站位 2m 层和 10m 层以外, 同一站位的相同分层采用 DNA 和 cDNA 测序方法所获得的样本差异不显著 (图 4)。即整体上, 各个水层间的纤毛虫群落的差异大于方法学造成的群落差异。

DNA 和 cDNA 测序所检获的纤毛虫均隶属于 7 个纲 (图 5a)。两种方法均显示旋唇纲相对丰度和 OTUs 数最高, 且主要由舞毛亚纲和寡毛亚纲构成。比较分析 40m 以浅和 40m 以深样本, DNA 和 cDNA 测序所揭示的不同纲/亚纲相对丰度和丰富度的变化规律一致: 从 40m 以浅到 40m 以深, 舞毛亚纲、寡毛亚纲和叶咽纲相对丰度降低; 肾形纲、裂口纲、

寡膜纲和前口纲相对丰度增加(图 5b)。就相对丰度而言,舞毛亚纲、寡毛亚纲和前口纲相对丰度

降低;肾形纲、裂口纲、寡膜纲和叶咽纲相对丰度增加(图 5c)。

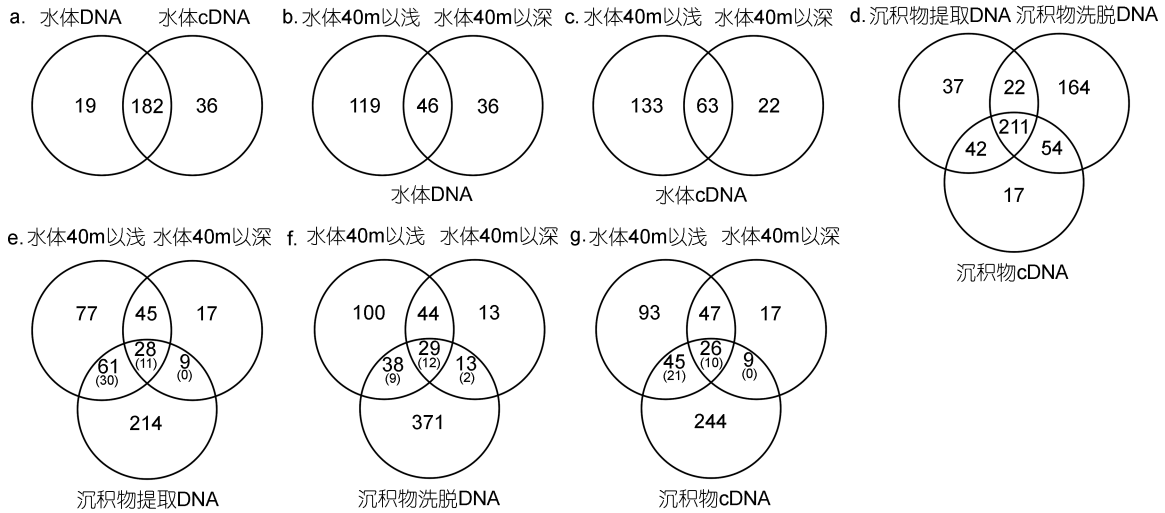


图 3 共有和特有 OTUs 数(括号内数字显示舞毛亚纲和寡毛亚纲纤毛虫 OTUs 数)

Fig.3 The number of unique and shared OTUs (the number of Choreotrichia and Oligotrichia OTUs was showed in brackets)

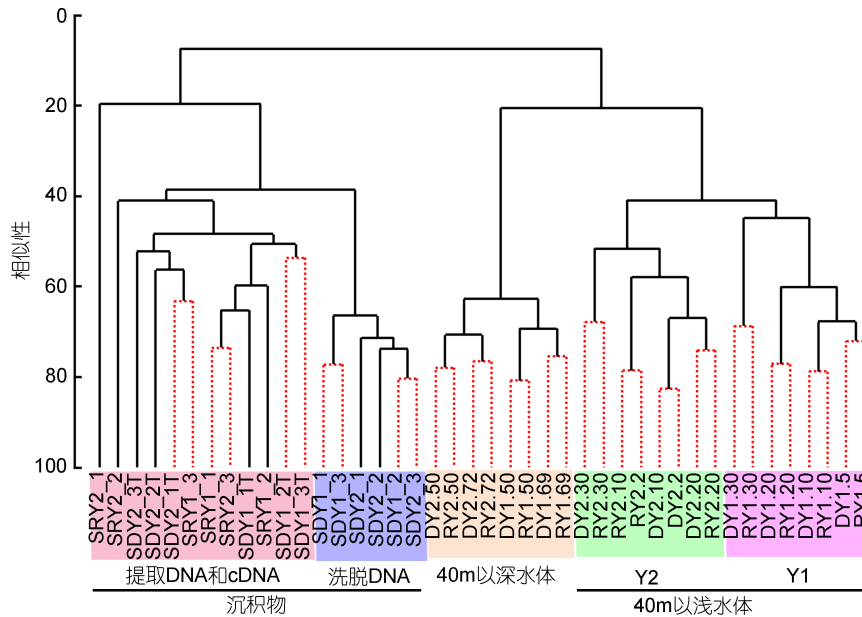


图 4 42 个测序样本聚类分析和 SIMPROF 分析(红色虚线显示差异不显著, $P>0.05$)

Fig.4 Clustering and SIMPROF analyses of all the 42 sequencing samples (the groups with no significant difference are shown with red dash lines, $P>0.05$)

注: 每个水层的 DNA 和 cDNA 测序样本(如 D/R/Y1.5: 基于 DNA/cDNA 测序 Y1 站位水体 5m 层)。每个站位沉积物提取 DNA(SDY1_1T-3T)、洗脱 DNA(SDY1_1-3)和 cDNA(SRY1_1-3)测序各三个重复测序样本

2.4 基于直接提取 DNA、洗脱 DNA 和 cDNA 测序的沉积物中纤毛虫多样性和群落结构

在沉积物中,提取 DNA、洗脱 DNA 和 cDNA 测序分别获得 312、451 和 324 个 OTUs, 211 个 OTUs 同时通过三种方法检获, 共有 OTUs 序列数分别占总序列数的 93.5%、79.2%和 82.1%(图 3d)。164 个

OTUs 仅通过洗脱 DNA 法检获, 其中 146 个 OTUs 相对丰度低于 0.1%。聚类分析结果显示, 基于洗脱 DNA 测序的 6 个样本聚集在一起, 且与基于提取 DNA 和 cDNA 测序的样本分开, ANOSIM 分析显示两大支群落结构差异显著($R=0.569, P=0.001$) (图 4)。

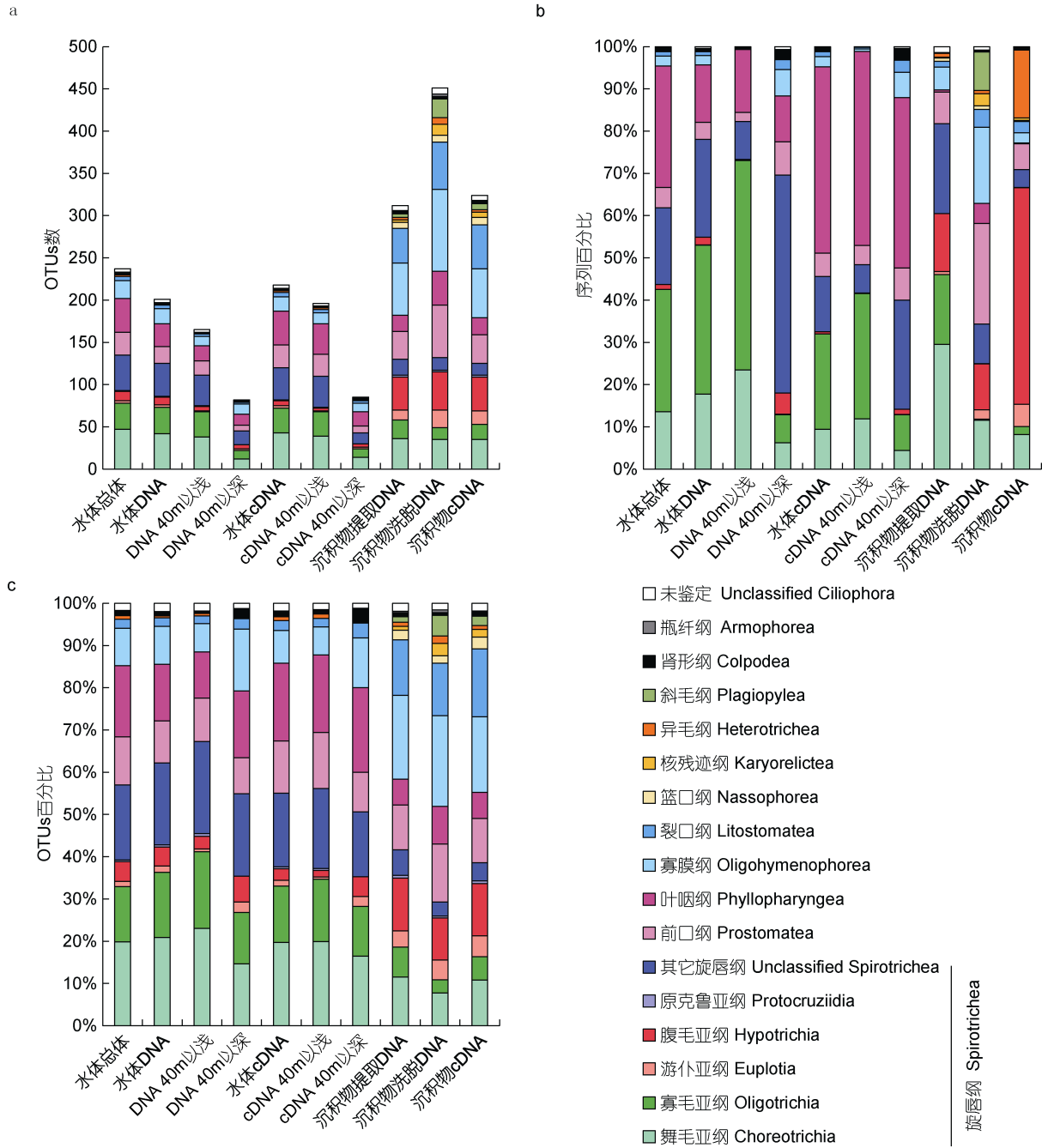


图 5 基于 DNA 和 cDNA 测序的纲/亚纲水平纤毛虫 OTUs 数(a)、序列百分比(b)和 OTUs 百分比(c)

Fig.5 The number of ciliates OTUs (a), the proportions of sequences (b) and OTUs (c) at class/subclass level based on DNA and cDNA sequencing

提取 DNA 和洗脱 DNA 测序检获的纤毛虫均隶属于 11 个纲, 包括水体检获的 7 个纲, 以及瓶纤纲 (Armophorea)、核残迹纲 (Karyorelictea)、篮口纲 (Nassophorea) 和斜毛纲 (Plagiopylea) (图 5a)。cDNA 测序检获的纤毛虫隶属于 10 个纲, 其中瓶纤纲未获得。三种方法均显示旋唇纲相对丰度最高, 其中提取 DNA 测序检获的舞毛类和寡毛类相对丰度高达

46.0%, OTUs 数为 58 个, 占比为 18.6%; 洗脱 DNA 测序次之, 该两类相对丰度为 11.8%, OTUs 数为 49 个, 占比为 10.9%; cDNA 测序所得的该两类浮游生纤毛虫相对丰度最低为 10.1%, 但 OTUs 数为 53 个, 占比为 16.4% (图 5b, 5c)。提取 DNA 和洗脱 DNA 测序显示前口纲相对丰度较高, 而 cDNA 测序显示异毛纲相对丰度较高 (图 5b)。

2.5 水体和沉积物中共有纤毛虫

鉴于水体 DNA 和 cDNA 测序所得 OTUs 构成极其相似, 因此整合 DNA 和 cDNA 数据, 共获得 237 个纤毛虫的 OTUs, 代表水体中纤毛虫群落, 40m 以浅和以深水层分别获得 211 和 99 个 OTUs。

在沉积物中, 提取 DNA 测序获得的 312 个 OTUs 中, 98 个可以同时在水体中检获, 其中, 40m 以浅水层中检获 89 个, 包括 41 个舞毛类和寡毛类 OTUs; 40m 以深水层中检获 37 个, 包括 11 个舞毛类和寡毛类 OTUs, 且该 11 个 OTUs 均可在浅水层中检获(图 3e)。

沉积物洗脱 DNA 测序获得的 451 个 OTUs 中, 80 个可以同时在水体中检获, 其中, 40m 以浅水层中检获 67 个, 包括 21 个舞毛类和寡毛类 OTUs; 40m 以深水层中检获 42 个, 包括 14 个舞毛类和寡毛类 OTUs, 该 14 个 OTUs 中 12 个可以在浅水层中检获(图 3f)。

沉积物 cDNA 测序获得的 324 个 OTUs 中, 80 个可以同时在水体中检获, 其中, 40m 以浅水层中检获 71 个, 包括 31 个舞毛类和寡毛类 OTUs; 40m 以深水层中检获 35 个, 包括 10 个舞毛类和寡毛类 OTUs, 该 10 个 OTUs 均可在浅水层中检获(图 3g)。

在多样性构成上, 三种沉积物纤毛虫多样性评估方法显示, 水体和沉积物中共有的 OTUs 主要隶属于浮游纤毛虫舞毛亚纲和寡毛亚纲(图 6)。沉积物、水体 40m 以浅和 40m 以深水层共有的舞毛和寡毛类 OTUs, 在水体中的相对丰度较高, 序列占总序列数

的 18.7%—32.7%。沉积物和 40m 以浅水层共有, 而未在 40m 以深水层中获得的舞毛和寡毛类 OTUs, 在水体中的相对丰度较低, 占总序列数的 0.2%—2.9%。如 OTU169 高斯类铃虫(*Codonellopsis gaussi*), 其通过三种方法均可在沉积物中检获, 同时仅存在于 40m 以浅水层中, 在水体中的相对丰度为 0.04%。

水体和沉积物共有舞毛类和寡毛类 OTUs, 在沉积物中总的相对丰度为 3.8% (cDNA 测序), 8.7% (洗脱 DNA 测序), 39.2% (提取 DNA 测序) (图 7)。水体和沉积物共有的舞毛类和寡毛类 OTUs 中大部分 (63.4%—67.7%) 在水体中的相对丰度高于在沉积物中的相对丰度, 但是 OTU14 拟急游虫(*Strombidinopsis acuminata*) 在沉积物中的序列数为 371 (cDNA 测序)—7019 (提取 DNA 测序), 而在水体中仅获得 5 条序列。

此外, 沉积物和水体共有 OTUs 还包括腹毛亚纲、前口纲和异毛纲等优势类群(图 6)。沉积物洗脱 DNA 中, 与水体共有序列主要隶属于前口纲, 相对丰度为 11.7% (图 7b), 其中, OTU40 隐核虫属(*Cryptocaryon* sp.) 贡献最大, 而在水体中仅一条序列。沉积物 cDNA 中, 与水体共有序列主要隶属于腹毛亚纲和异毛纲, 其相对丰度分别为 46.1% 和 16.1% (图 7c)。在腹毛亚纲中, OTU2 缩颈半腹柱虫(*Hemigastrostyla enigmatica*) 贡献最大, 其在水体中仅一条序列。异毛纲中, OTU7 突口虫属(*Condylostoma* sp.) 贡献最大, 其在水体中亦只有一条序列。

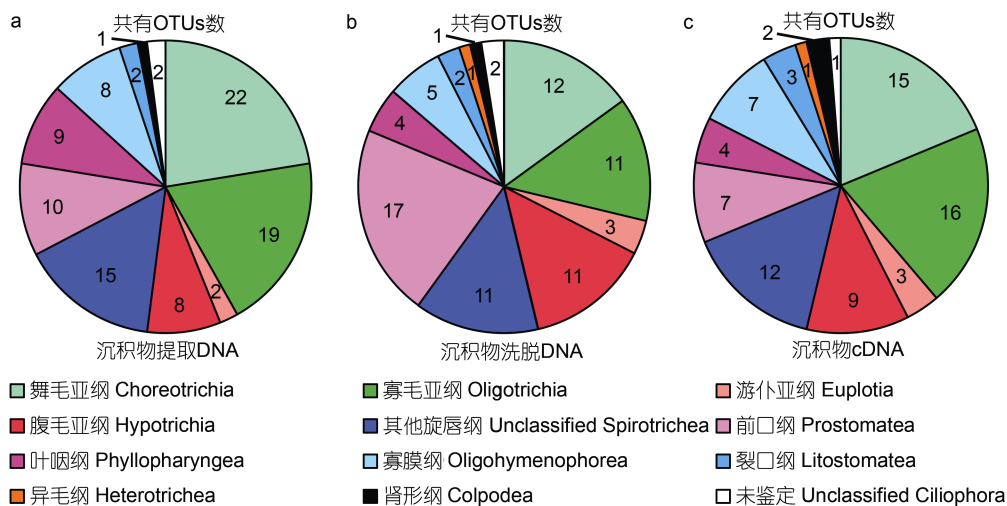


图 6 基于提取 DNA (a)、洗脱 DNA (b) 和 cDNA (c) 测序的沉积物和水体中共有的纤毛虫 OTUs 构成

Fig. 6 The composition of the ciliate OTUs shared in waters and sediments based on the extraction DNA (a), elution DNA (b) and cDNA (c) sequencing

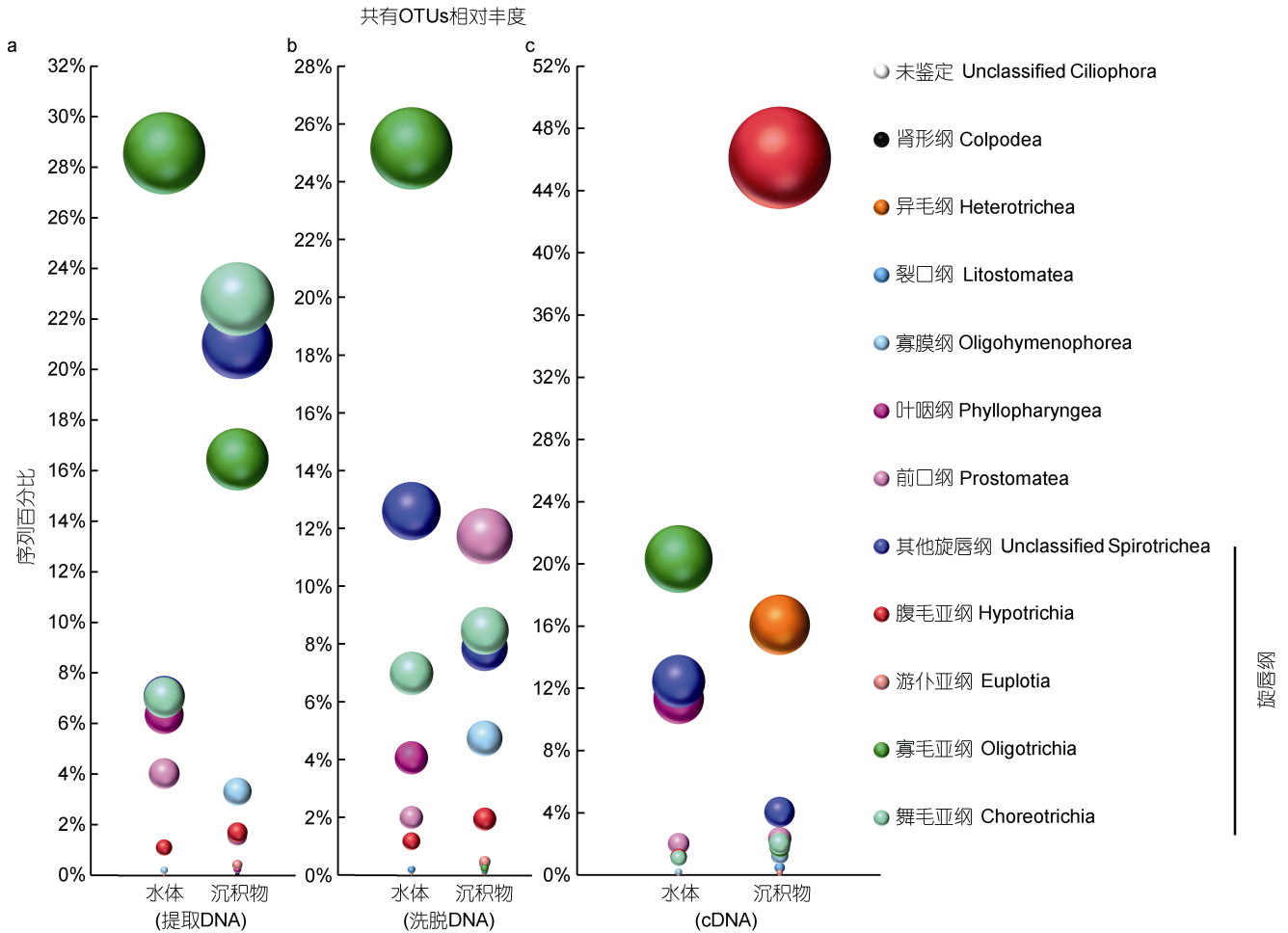


图 7 基于提取 DNA (a)、洗脱 DNA (b) 和 cDNA (c) 测序的沉积物和水体中共有的纤毛虫 OTUs 相对丰度

Fig. 7 The relative abundance of the ciliate OTUs shared in waters and sediments based on the extraction DNA (a), elution DNA (b) and cDNA (c) sequencing

3 讨论

3.1 不同水层中水体纤毛虫对沉积物中纤毛虫分子多样性评估的影响

本研究采用三种不同沉积物中的纤毛虫分子多样性研究方法, 结果显示沉积物中 18% (洗脱 DNA) 到 31% (提取 DNA) 的 OTUs 可以在水体中检获。这与前人报道的近海沉积物中 25%—30% 的真核微生物 OTUs 可以在上层水体中检获的结果相近 (Forster *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017)。但是, 过去的研究侧重探讨浮游和底栖原生物地理分布模式的差异, 并未研究海水和沉积物中共有物种的构成, 且缺少不同水层水体对沉积物微生物生物多样性评估影响的研究。

本研究发现浅层水中纤毛虫对沉积物纤毛虫分子多样性评价的影响大于深层水, 沉积物与水体共有的纤毛虫 OTUs 绝大部分仅在 40m 以浅水层中检

获, 而未在 40m 以深水层中检获 (图 3e, 3f, 3g)。通常, 浅层水、深层水和沉积物共有的寡毛类和舞毛类 OTUs 中, 80% 以上在水体中的相对丰度高于在沉积物中的相对丰度, 且一半以上的 OTUs 在水体中的相对丰度大于 1%。优势浮游类群的扩散能力较强, 因此可以同时浅层水和深层水中检获 (Tucker *et al.*, 2017), 且优势浮游类群的 DNA 和 RNA 可沉降到沉积物中并得以保存, 因此亦可在沉积物中检获。还有部分共有 OTUs 在沉积物中的相对丰度较高, 如拟急游虫 (*Strombidinopsis acuminata*) 在沉积物中检获千余条序列, 而在水体中仅检获 5 条。推测此类纤毛虫可能主要以包囊的形式存在于沉积物中。少数舞毛类和寡毛类纤毛虫可以包囊的形式存在于沉积物中 (Doherty *et al.*, 2010), 在环境适宜时脱包囊, 重新进行浮游生活 (Massana *et al.*, 2015)。

仅在沉积物和浅层水同时检获的寡毛类和舞毛

类 OTUs, 在水体中总的相对丰度较低(0.2%—2.9%)。此类稀有浮游 OTUs 可能主要分布于浅层水中, 温度可能是控制其分布的重要因子, 因为 40m 以浅水层温度为 17—28°C, 而底层水温仅约 8.0°C。水深也可能是限制此部分纤毛虫分布的重要因素, 如高斯类铃虫(*Codonellopsis gausi*)仅在浅层水中发现, 而未见于深层水中(梁晨, 2019)。

海水和沉积物共有的 OTUs 除了以上浮游生舞毛类和寡毛类纤毛虫, 还包括在沉积物中占优势的腹毛亚纲等, 该类群亦偶尔在水体中检获。如缩颈半腹柱虫(*Hemigastrostyla enigmatica*)通常在底质表面爬行, 属周丛生纤毛虫, 该物种普遍检获于沉积物, 且具有相对较高的丰度, 而在水体中仅检获了 1 条序列。

3.2 不同方法对陆架海区水体和沉积物中纤毛虫多样性评估的影响

DNA 和 cDNA 测序方法检获群落的相似性, 因研究对象和研究海域的不同而有所差异(Massana *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017)。本研究首次同时提取了不同水层和沉积物中的 DNA 和 RNA, 其中, 沉积物 DNA 提取采用直接提取和洗脱两种不同方法, 测序获得纤毛虫的分子多样性信息, 探讨不同方法对近海水体或沉积物中纤毛虫多样性评估的影响。

水体样品中, DNA 和 cDNA 测序方法所检获的纤毛虫在多样性构成上较为一致, 共有序列占总序列数的 99%以上, 且两种方法获得的特有 OTUs 均为稀有类群, 可能由于 PCR 扩增偏好性和反转录过程导致(Gonzalez *et al.*, 2012)。同一站位相同分层采用不同测序方法所获得的纤毛虫群落结构差异不显著, 但不同分层间的差异极显著。然而, DNA 测序中叶咽纲纤毛虫序列比例明显低于 cDNA 测序。Zhao 等(2017)在西太平洋表层水体到 2000m 以深水体中亦发现类似现象, 可能由于叶咽纲纤毛虫具有较低 rRNA 基因拷贝数, 且相对较高的代谢活性所致(Gong *et al.*, 2013)。

沉积物中的纤毛虫群落明显不同于水体, 而方法学导致的纤毛虫群落差异大于样品间的群落差异。洗脱 DNA 测序方法所获得的 OTUs 数明显高于提取 DNA 和 cDNA 测序方法。本研究中洗脱 DNA 和 cDNA 测序方法所用的样品量相同, 且来源于同一样品, 因此洗脱 DNA 方法所获得的高多样性的原因在于 cDNA 测序主要检获活性生物多样性, 而 DNA 测

序还可检获胞外 DNA 和包囊多样性(Xu *et al.*, 2017)。样品量则是影响洗脱 DNA 和直接提取 DNA 多样性评估的重要因素(Penton *et al.*, 2016), 本研究中洗脱 DNA 测序样品量为提取 DNA 测序样品量的 2.2 倍, 因此所检获的 OTUs 数亦较高, 为提取 DNA 测序检获的 OTUs 数的 1.4 倍。

此外, 样品量不仅影响多样性, 对群落构成也具有显著影响, 不同样品量所获得的优势 OTUs 显著不同(Penton *et al.*, 2016)。提取 DNA 测序所得的浮游生寡毛类和舞毛类纤毛虫最占优势, 相对丰度高达 46.0%, 而其在洗脱 DNA 中的相对丰度仅为 11.8%, 获得的 OTUs 多样性明显增加。推测增大样品量, 提高了稀有类群的检出效率, 从而相对削弱了沉降下来的水体纤毛虫的 DNA 的影响。Ranjard 等(2003)研究指出尽管微型生物分布存在异质性, 当样品量大于 1g 时, 可较好地反应该生境的群落构成。

综上, 洗脱 DNA 和 cDNA 测序可显著降低水体纤毛虫对沉积物中的纤毛虫多样性评估的影响。且洗脱 DNA 较之 cDNA 测序在实际操作中具有诸多优势, 尤其适用于沉积物中纤毛虫的分子多样性研究。首先, 相同条件下 RNA 降解较快, 因此较之 RNA, DNA 易保存(Novitsky, 1986)。其次, 洗脱的 DNA 可直接进行扩增测序, 技术上简单易行, 而 RNA 需反转录成 cDNA 后才可扩增测序, 且反转录过程由于扩增偏好性, 可能会进一步降低稀有类群的检出效率(Gonzalez *et al.*, 2012)。

4 结论

DNA 和 cDNA 测序对水体中纤毛虫分子多样性研究的影响不显著, 而对沉积物中纤毛虫分子多样性影响极显著。沉积物中纤毛虫多样性高于水体, 浅层水中纤毛虫多样性高于深层水。浅层水中纤毛虫对沉积物中纤毛虫多样性评价的影响大于深层水。洗脱 DNA 测序与 cDNA 测序结果类似, 可降低水体 cDNA 对沉积物中的纤毛虫多样性评估的影响, 且洗脱 DNA 法较之 cDNA 法操作更简便, 避免了反转录过程导致的偏差, 适用于沉积物中的纤毛虫等真核微生物的分子多样性研究。

致谢 本课题组徐雨博士生采集样品, 在此谨致谢忱。

参 考 文 献

李 洁, 徐奎栋, 2016. 南黄海夏季纤毛虫等微小浮游动物丰度和生物量变动及其与沙海蜇旺发的关系. 海洋与

- 湖沼, 47(3): 612—625
- 宋微波, 沃伦 A, 胡晓钟, 2009. 中国黄渤海的自由生纤毛虫. 北京: 科学出版社, 1—515
- 周百灵, 维妙, 李菊等, 2016. 黄海底栖纤毛虫的群落结构与时空变化. 海洋与湖沼, 47(2): 336—345
- 黄平平, 赵峰, 徐奎栋, 2017. 基于形态学与核糖体 DNA 及其 cDNA 高通量测序的海洋沉积物中纤毛虫多样性比较. 海洋与湖沼, 48(2): 285—296
- 梁晨, 2019. 南大洋不同海区浮游纤毛虫群落研究. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 83
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J *et al*, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335—336
- Chen W D, Pan Y B, Yu L Y *et al*, 2017. Patterns and processes in marine microeukaryotic community biogeography from Xiamen coastal waters and intertidal sediments, southeast China. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1912
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A, 2005. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 46—50
- Doherty M, Tamura M, Vriezen J A C *et al*, 2010. Diversity of oligotrichia and choreotrichia ciliates in coastal marine sediments and in overlying plankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12): 3924—3935
- Edgar R C, Haas B J, Clemente J C *et al*, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194—2200
- Fenchel T, 2008. The microbial loop – 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366(1—2): 99—103
- Forster D, Dunthorn M, Mahé F *et al*, 2016. Benthic protists: the under-charted majority. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8): fiw120
- Gimmler A, Korn R, De Vargas C *et al*, 2016. The Tara Oceans voyage reveals global diversity and distribution patterns of marine planktonic ciliates. *Scientific Reports*, 6: 33555
- Gong J, Dong J, Liu X H *et al*, 2013. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist*, 164(3): 369—379
- Gonzalez J M, Portillo M C, Belda-Ferre P *et al*, 2012. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One*, 7(1): e29973
- Haas B J, Gevers D, Earl A M *et al*, 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3): 494—504
- Lara E, Berney C, Harms H *et al*, 2007. Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3): 365—373
- Li G H, Su L, Zhang Q Q *et al*, 2019. Molecular diversity and biogeography of benthic ciliates in the Bohai Sea and Yellow Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(2): 78—86
- Liu H X, Shen P P, Li C H *et al*, 2016. Composition and distribution of planktonic ciliates in the southern South China Sea during late summer: comparison between surface and 75 m deep layer. *Journal of Ocean University of China*, 15(1): 171—176
- Liu Y, Song S Q, Chen T T *et al*, 2017. The diversity and structure of marine protists in the coastal waters of China revealed by morphological observation and 454 pyrosequencing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 189: 143—155
- Magoč T, Salzberg S L, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957—2963
- Massana R, Gobet A, Audic S *et al*, 2015. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology*, 17(10): 4035—4049
- Meng Z C, Xu K D, Dai R H *et al*, 2012. Ciliate community structure, diversity and trophic role in offshore sediments from the Yellow Sea. *European Journal of Protistology*, 48(1): 73—84
- Novitsky J A, 1986. Degradation of dead microbial biomass in a marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3): 504—509
- Penton C R, Gupta V V S R, Yu J L *et al*, 2016. Size matters: assessing optimum soil sample size for fungal and bacterial community structure analyses using high throughput sequencing of rRNA gene amplicons. *Frontiers in Microbiology*, 7: 824
- Ranjard L, Lejon D P H, Mougél C *et al*, 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1111—1120
- Stock A, Edgcomb V, Orsi W *et al*, 2013. Evidence for isolated evolution of deep-sea ciliate communities through geological separation and environmental selection. *BMC Microbiology*, 13: 150
- Stoeck T, Bass D, Nebel M *et al*, 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19(S1): 21—31
- Torti A, Lever M A, Jørgensen B B, 2015. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, 24: 185—196
- Tucker S J, McManus G B, Katz L A *et al*, 2017. Distribution of abundant and active planktonic ciliates in coastal and slope waters off New England. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2178
- Xin M, Ma D Y, Wang B D, 2015. Chemicohydrographic characteristics of the Yellow Sea Cold Water Mass. *Acta Oceanologica Sinica*, 34(6): 5—11
- Xu D P, Li R, Hu C *et al*, 2017. Microbial eukaryote diversity and activity in the water column of the South China Sea

- based on DNA and RNA high throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1121
- Zhao F, Filker S, Xu K D *et al*, 2017. Patterns and drivers of vertical distribution of the ciliate community from the surface to the abyssopelagic zone in the Western Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2559
- Zhou B L, Xu K D, 2016. Spatiotemporal variation in community structure of marine benthic ciliates in the Yellow Sea during and after macroalgal and giant jellyfish blooms. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(4): 629—641

EFFECTS OF SEDIMENTATION OF DNA FROM OVERLYING WATERS ON THE EVALUATION OF CILIATE MOLECULAR DIVERSITY IN OFFSHORE SEDIMENTS

HUANG Ping-Ping^{1,2}, ZHAO Feng¹, XU Kui-Dong^{1,2}

(1. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract A high proportion of Choreotrichia and Oligotrichia, which are typically planktonic ciliates, has been frequently detected from marine sediments by DNA high-throughput sequencing. However, few of them could be observed with the morphological method. The influence of these environmental DNA (eDNA) in waters on assessing the ciliate diversity in sediments and the extent to which ciliates linking the sediments and overlying waters are far from being known. Based on the sediment and overlying water samples collected from two stations in the Yellow Sea Cold Water Mass, the ciliate molecular diversity in sediments in relation to that in the upper water layers was evaluated by using DNA and cDNA (complementary DNA) sequencing. The DNA in sediments was extracted by directly extraction and elution methods. Results show that the highest ciliate diversity in sediments was obtained by the treatment of DNA elution, which yielded 451 OTUs. By contrast, the direction extraction of DNA and the cDNA method detected only 312 and 324 OTUs, respectively. Among them, 211 OTUs were simultaneously detected by the three methods. The DNA elution method was more effective in the detection of rare taxa. Among the 164 OTUs exclusively detected by the DNA elution method, about 89% of them were rare taxa in relative abundance lower than 0.1%. DNA sequencing with the direct extraction of DNA from the sediments yielded a high proportion of Choreotrichia and Oligotrichia, which contributed about 46% of the total sequences, while DNA sequencing with the eluted DNA and cDNA sequencing yielded only about 12% and 10% of the total sequences, respectively. About 43%—71% of the total OTUs of Choreotrichia and Oligotrichia detected from the sediments were shared with those in the upper water layers (<40m), while only 19%—29% of these OTUs were shared with those in the lower water layers (>40m). Generally, these OTUs shared in the lower water layers and sediments could be obtained in the upper water layers. The planktonic eDNA that influenced the evaluation of the molecular diversity of ciliates in sediments was mainly originated from the upper water layers. For the assessment of the sediment ciliate diversity, both cDNA sequencing and DNA sequencing with the DNA elution could highly reduce the influence of the planktonic eDNA. Therefore, DNA sequencing with the DNA elution is more appropriate for the study of molecular diversity of ciliates and other microeukaryotes in sediments. Compared with cDNA sequencing, the DNA elution method is much easier to operate and can avoid some biases resulted from reverse transcription.

Key words ciliate; sea water; marine sediment; molecular diversity; DNA high-throughput sequencing; cDNA high-throughput sequencing