

## 沿海滩涂异育银鲫养殖池塘真核浮游生物 群落 DNA 指纹结构与理化因子的关系

吕林兰, 董学兴, 赵卫红, 杨蕴涵, 黄金田\*

(盐城工学院海洋技术系, 江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室, 江苏 盐城 224051)

**摘要:** 为研究沿海滩涂异育银鲫养殖池塘浮游生物群落周年变化及其与理化因子的关系, 2011 年每月采集养殖池塘水样, 测定相关理化因子。采用 18s rDNA PCR-DGGE 技术对真核浮游生物群落多样性进行了分析。运用 CCA 方法分析了真核浮游生物与理化因子的关系。结果表明: TP 含量为 0.17~1.12 mg/L, 7 月出现峰值。PO<sub>4</sub>-P 含量为 0.04~0.30 mg/L, 7 月和 8 月较高。NO<sub>2</sub>-N 含量为 0.02~0.57 mg/L, 12 月最高。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量为 0.20~2.37 mg/L, 5 月出现峰值。NO<sub>3</sub>-N 含量为 0.04~10.47 mg/L, 11 月出现峰值。DGGE 结果显示, 1—12 月共有 73 条谱带, 平均每月谱带数为 24.67。5 月、6 月、8 月和 9 月份多样性指数较高。谱带匹配后聚类分析表明: 除 3 月、7 月和 11 月份外, 真核浮游生物变化具有季节性, 其中 8 月、9 月和 10 月聚为一支, 4 月、5 月和 6 月聚为一支, 1 月、2 月和 12 月聚为一支。CCA 分析表明, 温度、TP 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 与真核浮游生物群落结构组成显著相关, 为养殖生态调控和养殖模式优化提供理论依据。

**关键词:** 真核浮游生物; 变性梯度凝胶电泳; 滩涂池塘; DNA 指纹; 理化因子

**中图分类号:** S 965.117

**文献标志码:** A

养殖池塘中真核浮游生物是鱼虾的天然饵料基础, 在池塘水生态系统物质循环和能量流动等方面发挥着极其重要的作用。浮游植物是水生态系统中重要的初级生产者, 是水生态系统物质和能量的重要来源。在养殖池塘中, 水温、营养盐等环境因子均影响浮游植物密度, 而浮游植物种类或生物量的变化又直接或间接影响浮游动物、浮游细菌群落等其他浮游生物群落<sup>[1-3]</sup>。吴利等<sup>[4]</sup>利用 RAPD 和 DGGE 技术研究发现, 天然水体中理化因子与浮游生物群落结构具有相关性。养殖池塘中, 由于人为放养不同食性的鱼类, 对浮游生物具有下行效应, 加之投饵、施药等人为因素的干预, 其生物群落结构变化更为复杂。

浮游生物具有个体小、世代时间短等特点, 用传统方法鉴定费时且要求操作人员具有丰富的分类学知识并熟练掌握相关鉴定技术, 一些生物种

类常因个体太小或在保存过程中裂解等原因而可能未被检出, 从而导致测得物种多样性较实际物种多样性低。变性梯度凝胶电泳法 (DGGE) 是一种基于分离核酸片段大小相同而碱基组成不同的基因片段的技术, 该技术理论上可以分辨只有一个碱基差异的基因序列, 最初主要用于医学上基因点突变的检测, 1993 年 Mulyzer 等<sup>[5]</sup>首次将该技术应用于微生物生态学研究, 从而成为研究微生物多样性和种群差异的重要技术手段。近年来 DGGE 在水产养殖中也得到了应用: 如水体环境微生物、水产动物肠道原核微生物及水产系统微生物生态的研究<sup>[6-8]</sup>。

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是江苏盐城地区沿海滩涂池塘的重要养殖鱼类, 其生长速度快, 抗逆性强, 肉味鲜嫩, 深受消费者喜爱。滩涂池塘最主要的特点是单口池塘面积较大, 且池水具有

收稿日期: 2013-07-17 修回日期: 2013-12-17

资助项目: 江苏省三项工程项目 (PJ 2010-59); 国家自然科学基金项目 (31101887); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012675, BK2011419)

通信作者: 黄金田, E-mail: hjt@ycit.cn

一定盐度,故其水质有别于淡水池塘。本实验选取盐城地区滩涂异育银鲫养殖的典型模式(以异育银鲫为主,混养少量鲢 *Hypophthalmichthys molitrix*、鳙 *Hypophthalmichthys nobilis*)池塘,对其理化因子周年变化进行了调查,并采用 PCR-DGGE 技术研究了其真核浮游生物多样性周年变化,运用典型对应分析(CCA)法分析浮游生物群落与理化因子的相关性,以期对养殖生态调控和养殖模式优化提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

采样鱼塘位于盐城射阳某养殖场,水深 1.7~1.8 m,面积 15.32 hm<sup>2</sup>,池水盐度 1~3,养殖年限为 8 年。2011 年 3 月,该塘投放鲢和鳙各 0.9、1.2 万尾,4 月投放异育银鲫 40 万尾。2011 年 1 月至 12 月,每月中旬在固定位置用采水器采集距池水表层 20 cm 左右深度水样 5 L,5 个采样点具体位置为:1、N 33°40.189',E 120°26.176';2、N 33°40.164',E 120°26.114';3、N 33°40.136',E 120°26.049';4、N 33°40.170',E 120°25.996';5、N 33°40.230',E 120°25.954'。水样取回后及时处理,测定相关理化因子。将采集水样摇匀后取 50 mL 2 份,一份经 4 000 r/min 离心 30 min,弃去上清液,所得沉淀用 1 mL 70% 乙醇溶液固定,保存于 -20 °C,用于 DGGE 分析,另一份用 1 mL 10% 甲醛溶液固定,保存于 4 °C,用于物种形态学鉴定。

### 1.2 水质测定方法

每月取样时用温度计现场测量水温。理化因子总磷(TP)、磷酸盐(PO<sub>4</sub>-P)、硝氮(NO<sub>3</sub>-N)、亚硝氮(NO<sub>2</sub>-N)和氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)均采用水质自动测定仪(GDYS-201M)测定,所用试剂盒为吉大小天鹅公司生产。

### 1.3 浮游生物分析

利用显微镜分析枝角类、桡足类、轮虫和浮游植物 4 大类浮游生物种类及其丰度<sup>[9-10]</sup>。

### 1.4 DGGE 电泳分析

基因组总 DNA 提取 用无菌蒸馏水洗涤固定样品 3 次,最后一次洗涤后转移到 1 mL 灭菌离心管中。DNA 提取按照试剂盒(Beijing TransGen Biotech Co,Ltd)提供的方法步骤进行。用 0.8% 琼脂糖凝胶对提取 DNA 样品进行检测,

并将提取 DNA 保存于 -20 °C。

真核浮游生物 18S rRNA 扩增和 DGGE 电泳检测 用于扩增真核生物 18S rRNA 基因的特异性引物为 F1427-GC 和 R1616<sup>[11]</sup>。采用 50 μL PCR 反应体系:5 μL 10 × buffer(含 Mg<sup>2+</sup>),4 μL 2.5 mmol/L dNTP 以及 1.0 μL 20 μmol/L 上下游引物,0.2 μL 5 U TaqDNA 聚合酶,1.5 μL DNA 混合模板(5 个取样点模板等量混合),用灭菌双蒸水补足至 50 μL 后置于 T-100(Bio-Rad 公司)PCR 扩增仪中扩增。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min,然后 35 个循环,94 °C 30 s 变性,64 °C 30 s 退火,72 °C 60 s 延伸,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。预期扩增片段约 210 bp。

DGGE 电泳采用 D-code System 突变分析系统(Bio-Rad 公司),PAGE 胶浓度为 10%,变性剂梯度 30%~50%(7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺为 100% 变性),电泳缓冲液为 1 × TAE。PCR 扩增产物经琼脂糖电泳检测,扩增特异性好,用扩增产物直接上样,点样量 40 μL。60 °C、75 V 电泳 16 h,电泳结束后采用快速银染法染色,Gel Doc XR<sup>+</sup> System(BIO-RAD)自动凝胶图像系统拍照。

### 1.5 数据处理

采用 SPSS 16.0 软件对各水质理化指标数据进行方差分析和 LSD 多重比较,比较各月之间的差异性,并采用二元定距变量相关分析法对各理化指标进行相关性分析。

DGGE 指纹图谱采用 Quantity One 软件分析。对图谱进行优化处理后经过泳道、条带识别和配对得到泳道间的对比分析结果,并进行 UPGMA 聚类分析;根据各样品检测到的 DGGE 条带数及各条带相对含量,计算真核浮游生物的 Shannon-Weaver 指数(H')、Simpson 指数(D)和 Pielou 指数(J)。采用 CANOCO 4.5 for Windows 软件对环境因子与真核浮游生物群落组成变化相关性进行典型对应分析(CCA),并用 499 次非限制性蒙特卡罗检验法验证计算结果显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 异育银鲫养殖池塘生物因子周年变化

轮虫密度在 4 月、7 月和 8 月密度较高,冬季密度很低,其中萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)除 11 月外其他各月都有出现,是小

型浮游动物优势类群(表1)。9月、10月藻类密度较高,分别为 $5.82 \times 10^4$ 和 $5.70 \times 10^4$ 个/mL。2月藻类密度最低,为 $0.98 \times 10^4$ 个/mL。一年中有9个月观察到小球藻存在,可见该藻是异育银鲫

养殖池塘水体中的优势浮游植物类群。本实验采用与DGGE分析一致的水样,为采水器采得而非浮游生物网捞取,运动较快的枝角类、桡足类等大型浮游动物在各月份水样中均未发现。

表1 异育银鲫养殖池塘生物因子周年变化

Tab.1 The annual variation of biological characteristics in culture ponds for *Carassius auratus gibelio*

	月份 month											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
轮虫 萼花臂尾轮虫 <i>Brachionus calyciflorus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
rotifer 晶囊轮虫属 <i>Asplanchna</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
水轮虫属 <i>Epiphanes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
多肢轮虫属 <i>Polyarthra</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尾突臂尾轮虫 <i>Brachionus caudatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
平均数/(个/mL) average	0.19	0.32	0.12	0.48	0.36	0.18	0.47	0.57	0.09	0.27	0.00	0.21
藻类 小球藻属 <i>Chlorella</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
algae 丝藻属 <i>Uathrix</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
栅藻属 <i>Scenedesmus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
微囊藻属 <i>Microcystis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
盘星藻属 <i>Pediastrum</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
鼓藻属 <i>Cosmarium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
平裂藻属 <i>Merismopedia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
颤藻属 <i>Oscillatoria</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
平均数/( $10^4$ /mL) average	3.25	0.98	1.70	0.86	1.61	3.04	2.02	1.62	5.82	5.70	4.71	2.60
原生动物/(个/mL) protozoa biomass	0.14	0.14	0.17	0.23	0.19	0.14	0.17	0.20	0.47	0.14	0.27	0.13

注:“+”表示有,“-”表示无

Notes:“+” represent yes,“-” represent no

## 2.2 异育银鲫养殖池塘理化因子周年变化

不同月份的池塘理化因子存在显著差异。TP全年含量为 $0.17 \sim 1.12$  mg/L,7月出现峰值(表2)。PO<sub>4</sub>-P全年变化较大,含量介于 $0.04 \sim 0.30$  mg/L,其中7月和8月份较高,显著大于6月和10月外的其他月份( $P < 0.05$ )。NO<sub>2</sub>-N全

年含量为 $0.02 \sim 0.57$  mg/L,其中12月含量最高。NH<sub>4</sub>-N全年含量为 $0.20 \sim 2.37$  mg/L,5月出现峰值,显著高于其他月份( $P < 0.05$ )。NO<sub>3</sub>-N全年含量在 $0.04 \sim 10.47$  mg/L,11月出现峰值。相关性分析表明,NO<sub>2</sub>-N与NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N显著负相关( $P < 0.05$ )。

表2 异育银鲫养殖池塘理化因子周年变化(平均值±标准差)

Tab.2 The annual variation of physicochemical parameters in culture ponds for *Carassius auratus gibelio* (mean ± SD)

月份 month	TP/(mg/L)	PO <sub>4</sub> -P/(mg/L)	NO <sub>2</sub> -N/(mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/L)	NO <sub>3</sub> -N/(mg/L)	T/°C
1	0.32 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.46 ± 0.08	0.24 ± 0.06	2.80 ± 0.30	0
2	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.21 ± 0.06	1.54 ± 0.17	3
3	0.30 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.90 ± 0.04	0.04 ± 0.01	4
4	0.31 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.89 ± 0.14	0.07 ± 0.01	17
5	0.44 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	2.37 ± 0.15	0.11 ± 0.02	19.5
6	0.35 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.66 ± 0.14	0.11 ± 0.03	21
7	1.12 ± 0.24	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.06	0.83 ± 0.03	2.97 ± 0.49	24
8	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.07	0.19 ± 0.02	0.39 ± 0.07	4.07 ± 0.61	26
9	0.31 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.12	25
10	0.44 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.61 ± 0.12	1.23 ± 0.25	18
11	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.40 ± 0.06	10.47 ± 2.27	13
12	0.27 ± 0.05	0.24 ± 0.01	0.57 ± 0.07	0.20 ± 0.06	3.37 ± 0.23	6

### 2.3 DGGE 分析异育银鲫养殖池塘真核浮游生物群落结构周年变化

1—12 月共检测到 73 条带,平均条带数为 24.67(图 1-a),各月份生物群落特征指数如表 3,表明异育银鲫养殖池塘具有较高真核浮游生物物种多样性。DGGE 条带、Shannon-Weaver 指数和 Pielou 指数变化趋势一致,而 Simpson 指数变化趋势则相反,表明随着真核微型浮游生物种类的增

加,群落多样性和均匀度增大,而相应优势度减小。5 月、6 月、8 月和 9 月生物多样性指数较高。利用 Quantity One 软件对各月份谱带匹配后聚类分析,结果表明,除 3 月、7 月和 11 月外,其余各月份真核浮游生物变化具有季节性,8 月、9 月和 10 月聚为一支,4 月、5 月与 6 月聚为一支,1 月、2 月和 12 月聚为一支(图 1-b)。8 月与 10 月相似度最高,为 45%。3 月与其他各月相似度最低。

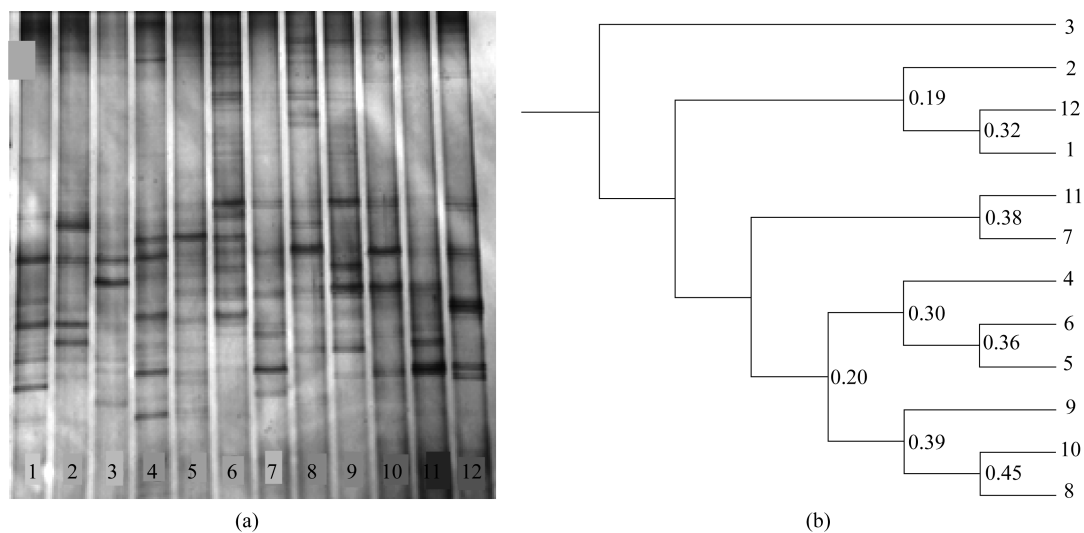


图 1 异育银鲫养殖池塘真核浮游生物 18S rRNA 基因片段 DGGE 电泳图 (a) 和 UPGMA 聚类图 (b) (1~12 表示 1~12 月份)

Fig. 1 Images of DGGE gels containing eukaryotic 18S rRNA gene fragments (a) and cluster analysis of eukaryotic plankton from culture pond for *Carassius auratus gibelio* (b) (1-12 means from Jan. to Dec.)

表 3 异育银鲫养殖池塘真核浮游生物群落特征指数周年变化  
Tab. 3 The annual variation of characteristic index of eukaryotic plankton community in culture ponds for *Carassius auratus gibelio*

月份 month	DGGE 条带数 number of DGGE bands	Shannon-Weaver 指数 $H'$	Simpson 指数 $D$	Pielou 指数 $J$
1	25	2.84	0.071	0.66
2	26	2.94	0.064	0.69
3	19	2.65	0.088	0.62
4	23	2.86	0.067	0.67
5	27	3.13	0.054	0.73
6	30	3.24	0.045	0.75
7	19	2.68	0.085	0.62
8	31	3.16	0.054	0.74
9	29	3.13	0.053	0.73
10	24	2.90	0.067	0.68
11	19	2.54	0.102	0.59
12	24	2.95	0.061	0.69

### 2.4 异育银鲫养殖池塘真核浮游生物与环境理化因子的 CCA 分析

真核浮游生物与环境理化因子的 CCA 分析

如图 2 所示。由蒙得卡德罗检验法分析得到, T、TP 和  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  与真核浮游生物群落结构组成显著相关 ( $P < 0.05$ ), 第一和第二轴的特征值分别是

0.332 和 0.294(表 4),说明这两轴同等重要。第一轴与 TP、T 相关系数较高,分别为 0.75、0.73 ( $P < 0.05$ )。第二轴与  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  相关系数高,为 0.91 ( $P < 0.05$ )。

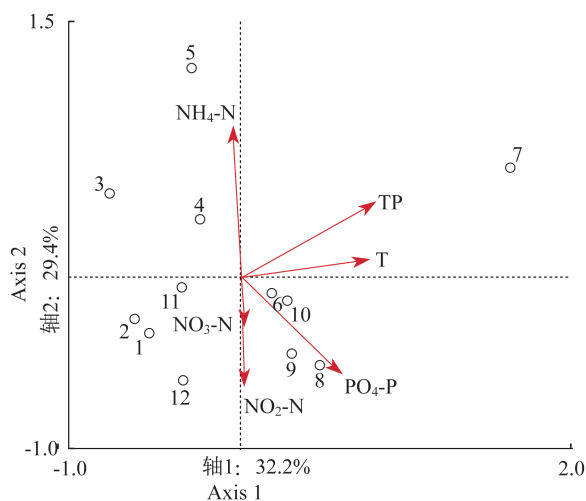


图 2 异育银鲫养殖池塘真核浮游生物与环境因子 CCA 二维图

Fig. 2 Correspondence canonical analysis (CCA) biplot based on DGGE data and environmental variables of culture ponds for *Carassius auratus gibelio*

表 4 异育银鲫养殖池塘环境因子与真核浮游生物群落 CCA 结果

Tab. 4 Results from CCA of eukaryotic plankton community data in relation to environmental parameters

CCA 轴 axes	1	2	3	4
特征值 eigenvalues	0.322	0.294	0.235	0.212
属种环境相关系数 species-environment correlations	0.974	0.988	0.994	0.982
累计方差百分比解释 cumulative percentage variance				
属种数据 of species data	14.5	27.8	38.4	48.0
属种环境关系 of species-environment relation	24.6	47.1	65.1	81.2

### 3 讨论

#### 3.1 异育银鲫养殖池塘环境理化因子的周年变化

水体中浮游生物种类及其丰度与营养盐密切相关,浮游植物特别是藻类原生质的生成有赖于碳、氮、磷的存在。在天然湖泊中,当营养盐浓度低时,藻类密度通常亦较低,若营养盐浓度增加,浮游植物密度也会随之增加。而藻类作为初始生

产者,它的改变必然会影响食物链中其他生物的群落结构。本研究表明:异育银鲫养殖池塘  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量 3—5 月较低,6—8 月较高,全年最高值出现在 8 月。温度是藻类生长的重要限制因素,低温季节藻类生物量通常比较低,对水体中氮、磷等营养盐的利用相对较少。3 月份以后,水温逐步回升,藻类大量繁殖,尤其是小球藻发展成为优势类群,大量消耗水体中的磷,使得磷酸盐浓度显著下降。2011 年 3 月投放鲢和鳙鱼种、4 月投放异育银鲫鱼种后,池水  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度也随之上升,这表明鱼种放养、投饵等池塘养殖行为会对  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度产生重要影响。养殖鱼类以及浮游动物的下行效应,使得浮游植物生物量下降,从而又减少其对磷的利用,加之投饵、鱼类代谢以及鱼类活动增加底泥中内源  $\text{PO}_4\text{-P}$  的释放,使得  $\text{PO}_4\text{-P}$  在 7 月和 8 月达到峰值。

#### 3.2 异育银鲫池塘真核浮游生物群落与环境理化因子的相关性

微型及超微型真核浮游生物群落包括浮游植物和浮游动物两大类群,作为异育银鲫养殖池塘水域生态系统中主要的初级生产者和初级消费者,对该系统物质循环和能量流动发挥着极其重要的作用。真核浮游生物除了肉眼可见的大型浮游生物外,还有藻类、原生动物(如鞭毛虫、纤毛虫)等超微型( $0.2 \sim 5 \mu\text{m}$ )和微型( $5 \sim 20 \mu\text{m}$ )真核浮游生物。一些微型、超微型浮游生物由于形态结构具可变性,缺乏独特的形态特征,而致使基于形态学特征的传统显微观察无法对其准确鉴定,从而导致测得物种多样性较实际物种多样性少。本研究采用同一匀质水样分别进行传统显微分类和基于 DGGE 的 DNA 分子标记研究,结果表明,1—12 月分子标记共检测出 73 个物种,分子标记测得的生物多样性远高于传统显微观察法的分类鉴定结果。从显微观察结果可以看出,萼花臂尾轮虫是小型浮游动物中的优势类群,偶或见到桡足类幼体,未采集到运动能力较强的大型枝角类,说明本实验中 DGGE 标记的真核浮游生物以微型和超微型浮游生物为主。

已有研究表明,营养水平、水温、底泥再悬浮、浮游植物、后生浮游动物与真核微型浮游生物群落结构组成密切相关<sup>[12-15]</sup>。Lepère 等<sup>[15]</sup>研究发现,温度对水柱不同深度(5 m 和 30 m)真核微型浮游生物动态均具有显著影响,营养盐氮、总磷浓

度显著影响水面下 5 m 深度的真核微型浮游生物动态。营养盐水平亦显著影响湖水表层真核微型浮游生物群落结构<sup>[12]</sup>。Abrantes 等<sup>[16]</sup>调查分析了富营养化湖泊的理化因子及浮游生物周年变化,发现温度、挥发性固体、硬度、磷酸盐(可溶性活性磷)和 pH 等理化因子对水体中浮游植物影响最大。氮磷是衡量湖泊富营养化的重要指标,国际上,一般认为 TP 0.02 mg/L、TN 0.2 mg/L 为湖泊富营养化发生浓度<sup>[9]</sup>。相对于天然水域,养殖池塘的人工干预程度更大。由于生产过程中大量投饵以及鱼虾代谢废物的长期沉积,养殖池塘通常为富营养化状态。本实验理化因子调查表明,即使在营养盐浓度较低的冬春季节,水体氮磷浓度也远高于上述湖泊富营养化的营养盐浓度,说明该池塘处于富营养化状态。本研究结果表明 T、TP 和  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  与养殖池塘的真核浮游生物具有显著的相关性。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Hofle M G, Haas H, Dominik K. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(7): 3164 - 3174.
- [ 2 ] Pinhassi J, Sala M M, Havskum H, *et al.* Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 ( 11 ): 6753 - 6766.
- [ 3 ] Rooney-Varga J N, Giewat M W, Savin, M C, *et al.* Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment [ J ]. *Microbial Ecology*, 2005, 49 ( 1 ): 163 - 175.
- [ 4 ] Wu L, Yu Y H, Zhang T L, *et al.* Relationship between DNA fingerprinting structure of plankton community and physicochemical factors in Lake Niushan [ J ]. *Journal of Lake Science*, 2008, 20(2): 235 - 241. [ 吴利, 余育和, 张堂林, 等. 牛山湖浮游生物群落 DNA 指纹结构与理化因子的关系. *湖泊科学*, 2008, 20(2): 235 - 241. ]
- [ 5 ] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [ J ]. *Applied and Environment Microbiology*, 1993, 59(3): 695 - 700.
- [ 6 ] Yang C X, Li Y, Zhang J Y, *et al.* Seasonal changes of bacterial community composition in digestive diverticula of scallops *Chlamys farreri* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36 ( 10 ): 1579 - 1584. [ 杨彩霞, 李赞, 张婧宇, 等. 栉孔扇贝消化盲囊细菌群落组成的季节变化分析. *水产学报*, 2012, 36(10): 1579 - 1584. ]
- [ 7 ] Wang R X, Wang J Y, Xu L W, *et al.* Annual changes of heterotrophic bacteria and vibrios in intestine and rearing water of maricultured cobia, *Rachycentron cannadum* Linnaeus [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15 ( 6 ): 1008 - 1015. [ 王瑞旋, 王江勇, 徐力文, 等. 军曹鱼肠道及水体异养菌和弧菌的周年变化. *中国水产科学*, 2008, 15(6): 1008 - 1015. ]
- [ 8 ] Wu Y S, Li Y, Wang N, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis ( DGGE ) to study the diversity of eukaryotic nanoplankton in the sea area for scallop culture [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36 ( 1 ): 140 - 147. [ 吴寅嵩, 李赞, 王娜, 等. 应用 DGGE 技术研究扇贝养殖海域微型真核浮游生物多样性. *水产学报*, 2012, 36 ( 1 ): 140 - 147. ]
- [ 9 ] Jin X C, Tu Q Y. Criterion of investigation on Lake Eutrophication [ M ]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990. [ 金湘灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. ]
- [ 10 ] Zhang Z S, Huang X F. Study method on freshwater plankton [ M ]. Beijing: Science Press, 1991. [ 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991. ]
- [ 11 ] van Hannen E J, van Agterveld M P, Gons H J, *et al.* Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis [ J ]. *Journal of Phycology*, 1998, 34(2): 206 - 213.
- [ 12 ] Lefranc M, Thénot A, Lepère C, *et al.* Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status [ J ]. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71(10): 5935 - 5942.
- [ 13 ] Garstecki T, Verhoeven R, Wickham S A, *et al.* Benthic-pelagic coupling: a comparison of the community structure of benthic and planktonic heterotrophic protists in shallow inlets of the southern Baltic [ J ]. *Freshwater Biology*, 2000, 45 ( 2 ): 147 - 167.
- [ 14 ] Arndt H. Rotifers as predators on components of the

- microbial web ( bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates)-a review [ J ]. *Hydrobiologia*, 1993, 255 – 256 ( 1 ) : 231 – 246.
- [ 15 ] Lepère C, Boucher D, Jardillier L, *et al.* Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem ( Lake Pavin ) [ J ]. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 72 ( 4 ) : 2971 – 2981.
- [ 16 ] Abrantes N, Antunes S C, Pereira M J, *et al.* Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake ( Lake Vela, Portugal ) [ J ]. *Acta Oecologica*, 2006, 29 ( 1 ) : 54 – 64.

## DNA fingerprinting structure of eukaryotic plankton community and its relations to physicochemical factors of aquaculture pond with *Carassius auratus gibelio* in coastal mudflat

LV Linlan, DONG Xuexing, ZHAO Weihong, YANG Yunhan, HUANG Jintian\*

( *Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Key Laboratory for Aquaculture and Ecology of Coastal Pool of Jiangsu Province, Yancheng 224051, China* )

**Abstract:** In order to study eukaryotic plankton community succession, and the relationship between eukaryotic plankton community and physicochemical factors in the ponds with *Carassius auratus gibelio* in coastal mud flat, water samples were collected monthly in 2011. We measured the relevant physicochemical factors, analyzed the diversity of eukaryotic plankton community by 18s rDNA PCR-DGGE technique, and analyzed the relationship between the plankton community and physicochemical factors by canonical correspondence analysis (CCA) method. The results showed that the concentration of total phosphorus (TP) ranged from 0.17 to 1.12 mg/L all the year round, and presented its peak value in July. The range of phosphate (PO<sub>4</sub>-P) concentration was from 0.04 to 0.30 mg/L, and the peak values occurred in July and August. The range of nitrite (NO<sub>2</sub>-N), ammonia-nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) and nitrate (NO<sub>3</sub>-N) concentration was 0.02 – 0.57 mg/L, 0.20 – 2.37 mg/L, 0.04 – 10.47 mg/L, and their peak values occurred in December, May and November, respectively. DGGE profiles of 18S rRNA gene fragments from the pond revealed that the diversity of eukaryotic plankton assemblages was highly variable. A total of 73 observable bands were amplified from January to December, and the average was 24.67. Shannon-Wiener index of pond was higher in May, June, August and September. The cluster analysis (UPGMA) dendrograms of eukaryotic plankton revealed remarkable seasonality except for March, July and November. August, September and October clustered into one group. April, May and June clustered into one group, and January, February, December clustered into one group. CCA revealed that temperature, total phosphorus and ammonia-nitrogen played a key role in the structure of the eukaryotic plankton community in pond, which can provide a theoretical basis for ecological regulation of aquaculture and optimization of aquaculture model. DGGE method was a cost-effective way to gain insight into seasonal dynamics of eukaryotic plankton communities in culture ponds.

**Key words:** eukaryotic plankton community; denaturing gradient gel electrophoresis; aquaculture pond of coastal mudflat; DNA fingerprint; physicochemical factors

**Corresponding author:** HUANG Jintian. E-mail: hjt@ycit.cn