

学校编码: 10384
学号: 33120141151694

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

亚热带潮间带底栖微型真核生物
多样性研究

Study on the Benthic Microeukaryotes Diversity in
Subtropical Intertidal Sediments

孔洁

指导教师姓名: 孙萍 副教授
专业名称: 环境科学
论文提交日期: 2017年4月
论文答辩时间: 2017年5月

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	VII
Abstract.....	IX
第一章 绪论	1
1.1 潮间带生态系统.....	1
1.2 底栖微型真核生物研究简介.....	2
1.3 微型真核生物分子生态学研究方法进展.....	3
1.3.1 分子标记技术.....	3
1.3.2 变性梯度和温度梯度凝胶电泳.....	4
1.3.3 高通量测序技术.....	5
1.4 研究意义与特色.....	5
第二章 漳江口红树林底栖微型真核生物的多样性研究	7
2.1 漳江口红树林概况.....	7
2.2 实验材料和方法.....	7
2.2.1 采样时间和地点.....	7
2.2.2 非生物因子的采集与测定.....	8
2.2.3 生物因子的测定.....	9
2.2.4 沉积物中总 RNA 提取及逆转录.....	9
2.2.5 18S rRNA V4 区扩增与 PCR 产物纯化.....	10
2.2.6 Illumina 测序及测序结果优化.....	10
2.2.7 高通量测序数据分析.....	11
2.2.8 丰富 (abundant) 和稀有 (rare) OTUs.....	11
2.2.9 Alpha 多样性指数计算.....	11
2.2.10 Beta 多样性分析.....	13
2.3 实验结果.....	14
2.3.1 非生物因子.....	14

2.3.2 生物因子.....	17
2.3.3 Alpha 多样性及其与环境因子的相关性.....	21
2.3.4 底栖微型真核生物群落组成.....	24
2.3.5 微型真核生物群落相似性分析.....	27
2.3.6 微型真核生物对环境因子的响应.....	31
2.4 讨论.....	36
2.4.1 部分数据的缺失.....	36
2.4.2 底栖微型真核生物群落组成.....	37
2.4.3 底栖微型真核生物群落的驱动因子.....	38
2.4.4 底栖微型真核生物优势类群和稀有类群的比较.....	39
2.5 小结.....	40
第三章 厦门近岸潮间带底栖微型真核生物时空分布.....	41
3.1 实验材料与方法.....	41
3.1.1 采样时间和地点.....	41
3.1.2 样品的采集与测定.....	42
3.2 实验结果.....	43
3.2.1 非生物因子.....	43
3.2.2 生物因子.....	43
3.2.3 Alpha 多样性及其与环境因子的相关性.....	46
3.2.4 底栖微型真核生物群落组成.....	48
3.2.5 底栖微型真核生物群落相似性分析.....	50
3.2.6 环境因子对微型真核生物群落组成的影响.....	54
3.3 讨论.....	55
3.3.1 OTU 丰度和 Chao1 值.....	55
3.3.2 环境因子对微型真核生物组成的影响.....	56
3.4 小结.....	56
第四章 总结与展望.....	58
4.1 主要结论.....	58
4.2 创新点.....	59

4.3 不足之处.....	59
4.4 未来工作的展望.....	59
参考文献	60
致谢	68

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	VII
Abstract in English	IX
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Intertidal ecosystem	1
1.2 Overview of benthic microeukaryotes	2
1.3 Research progress of molecular ecology	3
1.3.1 Molecular marker techniques	3
1.3.2 DGGE and TGGE	4
1.3.3 High throughput sequencing	5
1.4 Study significance and characteristics	5
Chapter 2 Benthic microeukaryotes diversity in Zhangjiang estuary mangrove	7
2.1 Overview of Zhangjiang estuary mangrove	7
2.2 Experimental materials and methods	7
2.2.1 Sampling time and sites	7
2.2.2 Collection and determination of abotic factors	8
2.2.3 Collection and determination of biotic factors	9
2.2.4 Total RNA extraction from sediments and reverse transcription	9
2.2.5 Polymerase chain reaction and purification	10
2.2.6 Illumina sequencing and results optimization	10
2.2.7 Processing and analyses of data	11
2.2.8 Abundant and rare OTUs	11
2.2.9 Calculation of Alpha diversity indices	11
2.2.10 Analysis of Beta diversity	13
2.3 Results	14

2.3.1 Abotic factors	14
2.3.2 Boitic factors	17
2.3.3 Alpha diversity and related factors	21
2.3.4 Compositon of benthic microeukaryotes community	24
2.3.5 Analysis of similarities of microeukaryotes community	27
2.3.6 Response of microeukaryotes to environmental factors	31
2.4 Discussion	36
2.4.1 Missing of part data	36
2.4.2 Compositon of the benthic microeukaryotes community	37
2.4.3 The factors shaping benthic microeukaryotes.....	38
2.4.4 Comparison of the abundant and rare biosphere.....	39
2.5 Summary	40
Chapter 3 Spatio-temparal distribution of benthic microeukaryotes in Xiamen intertidal zones	41
3.1 Experimental materials and methods	41
3.1.1 Sampling time and sites	41
3.1.2 Collection and determination of samples.....	42
3.2 Results	43
3.2.1 Abotic factors	43
3.2.2 Boitic factors	43
3.2.3 Alpha diversity and related factors	46
3.2.4 Compositon of benthic microeukaryotes community	48
3.2.5 Analysis of similarities of microeukaryotes community	50
3.2.6 Response of microeukaryotes to environmental factors	54
3.3 Discussion	55
3.3.1 OTU richness and Chao1 index	55
3.3.2 The factors shaping benthic microeukaryotes.....	56
3.4 Summary	56
Chapter 4 Conclusions and prospects	58

4.1 Main conclusions	58
4.2 Highlights	59
4.3 Problems	59
4.4 Prospects of future work	59
References	60
Acknowledgement	68

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

微型真核生物指单细胞真核生物，其种类繁多，大小、形态、功能各异。微型真核生物在生态系统中作为初级生产者、消费者、分解者，同时作为连接微食物环与传统食物链的重要组成部分，在生态系统的物质循环和能量流动过程中扮演着重要角色。基于显微镜鉴定的传统方法仅能对特定的类群进行研究，无法对微型真核生物进行综合的探讨，从而限制了微型真核生物生态学的发展。近年来，高通量测序技术的应用推动了微生物生态学的迅速发展，被应用于多种环境中微型真核生物多样性研究。然而，对沉积物中微型真核生物的研究相对较少，且多集中于如热液口、浅海、湖泊等特定环境，鲜有对潮间带沉积物环境的研究。研究者们多使用 18S rDNA 作为研究对象，该基因在真核生物中存在拷贝数不同且可长时间存在于环境中，因而由 rDNA 所呈现出的群落结构与真实群落结构存在较大差异。因此，本工作以福建省典型的潮间带区域——漳江口红树林湿地（涵盖红树林区域、红树林与米草交错区、米草区域与光滩区域）、厦门近岸潮间带为研究区域，以区域中底栖微型真核生物为研究对象，分别进行为期一年（漳江口红树林湿地，采样频率为 2 月每次；厦门近岸潮间带，春、夏季各一次）的样品采集。通过对环境样品中 18S 核糖体基因（18S rRNA）V4 区扩增子进行高通量测序，揭示了潮间带区域底栖微型真核生物多样性的时空分布特征，并结合环境因子的相关分析，解析其多样性变动的驱动因素。本工作主要结果如下：

1) 漳江口红树林底栖微型真核生物多样性研究

(1) 群落组成：超类群水平上，底栖微型真核生物群落以异鞭毛类（Stramenopiles）为绝对优势类群，其序列丰度占总序列的 86.67%；囊泡类（Alveolata）次之，其相对丰度为 7.75%；而原始色素体类（Archaeplastida）、Hacrobia 类、无根虫门（Apusozoa）与未知真核类（unidentified microeukaryotes）相对丰度较低，均小于 0.2%。属级水平上，占全部序列相对丰度最高的 10 个属均属于异鞭毛类的硅藻门，占全部序列的 59.12%；其中未知有壳缝-羽纹类硅藻（unidentified Raphid-pennate）所占比例最高（12.56%），舟型藻属（*Navicula*）次之（10.88%）。

(2) Alpha 多样性：空间上，Richness 和 Shannon 指数均值均在光滩区最

高，且随采样深度加深而增大；Richness 指数均值在交错区最低，而 Shannon 指数均值米草区最低。时间上，Richness 和 Shannon 指数均值均在 2015 年 12 月最高；Richness 均值在 10 月最低，而 Shannon 指数均值在 8 月最低。Richness 指数与采样深度正相关，与叶黄素（Lutein）浓度负相关；Shannon 指数与盐度、铵盐浓度正相关，与叶黄素和叶绿素 *b* 浓度负相关。

(3) Beta 多样性：微型真核生物群落存在显著的月份差异性，不同植被覆盖区微型真核生物群落亦存在较显著的差异，而不同深度微型真核生物群落无显著的差异。分析表明，样品采集月份对微型真核生物组成的差异解释度最高，样品采集月份和采样地植被覆盖类型对微型真核生物总群落、优势类群（abundant OTUs）和稀有类群（rare OTUs）组成差异的解释度分别为 55.04%、61.81%和 44.81%。

2) 厦门近岸潮间带底栖微型真核生物多样性研究

(1) 群落组成：超类群水平上，底栖微型真核生物群落以异鞭毛类（Stramenopiles）为绝对优势类群，其序列丰度占总序列的 91.66%；其次是囊泡类（Alveolata）和有孔虫类（Rhizaria），相对丰度分别为 3.13%和 2.68%；而无根虫门（Apusozoa）、Hacrobia 类、原始色素体类（Archaeplastida）、古虫类（Excavata）和未知真核类（unidentified microeukaryotes）序列之和占总序列百分比小于 0.3%。属级水平上，占全部序列相对丰度最高的 10 个属均属于异鞭毛类的硅藻门，占全部序列的 76.2%；其中舟型藻属（*Navicula*）所占比例最高（20.98%），布纹藻属（*Gyrosigma*）次之（14.55%）。

(2) Alpha 多样性：Richness 指数范围为 1064-2841，平均 1886.5；Shannon 指数范围 4.09-7.13，平均 5.89。Richness 指数与重金属镉浓度显著负相关。

(3) Beta 多样性：微型真核生物群落组成存在明显的季节差异性，且微型真核生物的稀有类群季节性差异最大，全部类群次之，优势类群最小。pH、多甲藻素（peridinin）、岩藻黄素（fucoxanthin）、重金属镉和月份对微型真核生物组成的差异具有一定解释度，其中镉、岩藻黄素及月份对微型真核生物的全部类群、优势类群和稀有类群的解释度分别为 33.89%，35.66%和 32.76%。

关键词：红树林；潮间带；微型真核生物；18S rRNA；高通量测序；群落组成

Abstract

Microeukaryotes are single cell eukaryotes that are composed of large quantities of species differing in cell sizes, shapes and functions. Microeukaryotes can act as primary producers, consumers and decomposers, playing key roles in driving biogeochemical cyclings of marine ecosystems. Traditionally, morphological methods based on microscopic identifications were limited to specific groups and it is rather difficult to study all groups of microeukaryotes simultaneously which constrained the studies on the ecology of microeukaryotes. High throughput sequencing (HTS) has been applied to the study of microbial ecology including microeukaryotes in recent years, and a variety of habitats has been investigated. However, there are only a few studies focusing on microeukaryotes in the sediments, most of which were from specific environments such as hydrothermal vents, coastal seas and lakes rather than intertidal sediments. 18S rDNA (ribosomal DNA) gene has been widely used to infer the community structure of microeukaryotes. However, the copy numbers of 18S rDNA gene differ significantly in microeukaryotes and DNA can exist for a long time in the extracellular environments, the community compositions of micro-eukaryotic assemblages may be twisted from the real one when rDNA is used. Our study focused on benthic microeukaryotes diversity at typical intertidal zone in Fujian province by sequencing the hyper-variable V4 regions of SSU rRNA transcripts through HTP method. The current work aimed to reveal the spatial and temporal distribution pattern of benthic microeukaryotes, and to figure out the factors shaping the patterns observed. Our study includes two parts, one part focusing on benthic microeukaryotes in different sampling months, depths, and areas covered by different vegetation in the Zhangjiang estuary mangrove, and the other focusing on benthic microeukaryotes at different sites in Xiamen intertidal zone during different seasons.

The results are as follows:

Part one

Benthic microeukaryotes diversity in the Zhangjiang estuary mangrove sediments

- (1) Community composition: At super-group or phylum group level, Stramenopiles are the most abundant and account for 86.67% of all sequences followed by Alveolata which accounts for 7.75%, and Archaeplastida, Hacrobia, Apusozoa and unidentified microeukaryotes collectively are less than 0.2%. At genus level, the most abundant top 10 genera all belong to bacillariophyte, accounting for 59.12% of all sequences. Unidentified raphid-pennate are the most abundant genus accounting for 12.56% of total sequences, followed by *Navicula* which account for 10.88%.
- (2) Alpha diversity: mean Richness and Shannon indices increase with sampling depth and reach the maximum at mudflat area and in December, 2015. For the Richness index, the mean value reaches the lowest at ecotone and in October, 2015, and the mean value of the Shannon index reaches the lowest at *Spartina* area and in August. Richness index positively correlated with sampling depth and negatively correlated with lutein concentration, while Shannon index positively correlated with salinity and NH₄-N concentration, negatively correlated with lutein and chlorophyll*b* concentrations.
- (3) Beta diversity: benthic microeukaryotes community dramatically differ in sampling months and are shaped by different overland vegetation, however there is no significant difference among benthic microeukaryotes communities from different sampling depths. Season (sampling month) is the primary factor explaining the variance of the composition of microeukaryotes, and together with overland vegetation type, they can explain 55.04%, 61.81% and 44.81% of the variance of microeukaryotes, the abundant and the rare biosphere respectively.

Part two

Benthic microeukaryotes diversity at different sites in Xiamen intertidal zone

- (1) Community composition: At super-group or phylum group level, Stramenopiles are the most abundant and account for 91.66% of all sequences, followed by Alveolata and Rhizaria which accounts for 3.13% and 2.68%, and Apusozoa, Hacrobia,

Archaeplastida together with unidentified microeukaryotes collectively are less than 0.3% of the sequences. At genus level, the most abundant top 10 genera all belong to bacillariophyte, accounting for 76.2% of all sequences. The *Navicular* are the most abundant group accounting for 20.98% of total sequences, followed by *Gyrosigma* which account for 14.55%.

- (2) Alpha diversity: Richness index range from 1064 to 2841 (average 1886.5), and Shannon index range from 4.09 to 5.89 (average 5.89). Richness index negatively correlated with cadmium concentration.
- (3) Beta diversity: benthic microeukaryotes community, especially the rare biosphere, dramatically differ in sampling seasons. Factors such as pH, peridinin, fucoxanthin, cadmium concentration and sampling season are significantly correlated with benthic microeukaryotes community, while cadmium concentration, fucoxanthin and sampling season can explain 33.89%, 35.66% and 32.76% of the variance of microeukaryotes, the abundant and the rare biosphere respectively.

Key words: Mangrove; Intertidal zone; Benthic microeukaryotes; 18S rRNA; High throughput sequencing; Community composition

第一章 绪论

1.1 潮间带生态系统

潮间带 (intertidal zone) 是指潮位最高和潮位最低之间的区域, 换言之潮间带包括潮位最高时所淹没的区域至潮位最低时露出水面的区域。潮间带在近岸生态系统中扮演着重要的角色, 是水体与陆地的过度区域, 会受到海水周期性涨落的影响而被水体淹没和暴露于空气中, 亦会受到陆地淡水 (如雨水) 和河流淡水的注入而影响盐度, 也会受到人类生产生活等活动 (如生活污水、养殖废水等排放) 影响^[1], 因此其环境变化剧烈。尽管如此, 潮间带生态系统仍孕育着种类繁多的生物^[2], 包括多种红树植物、草本植物等植物, 多种贝类、蟹和鱼类等动物, 以及体积微小但种类和数量庞大的微生物。

潮间带生态系统包括红树林、泥滩和沙滩等多种生态类型。红树林生态系统周期性被潮水浸淹, 兼有水体和陆地的双重特征, 是已知生产力最高的生态系统之一, 且具有重要的生态、经济和社会价值^[3, 4]。红树林生态系统是综合复杂且动态的生态系统, 它在盐度、水位和营养盐的可利用性方面变化大, 它同时也孕育多样、独特的微生物群落。红树林生态系统具有重要的生态学作用, 从陆源向海洋输送碳的 11%^[5]和溶解有机碳 (Dissolved organic carbon, DOC) 的 10%^[6]要通过红树林。全球红树林面积在过去的二十年间由于水产养殖、农业灌溉、城镇化、畜牧业等类活动减少 20%-35%, 而仅有 6.9%受到保护^[7]。我国沿岸红树林生态系统还面临着外来物种-互花米草 (*Spartina alterniflora*) 的入侵威胁^[8, 9], 有研究指出被互花米草入侵了的土壤其中微生物群落组成和生物量显著改变^[10]。关于红树林中微生物及其与其它生态系统组成成分 (如植物根系) 相互作用的研究对我们认识红树林生态系统运转机制和修复具有非常重要的意义^[11]。揭示红树林生态系统中微生物群落的多样性和结构组成是更好认识它们在生态系统运转中作用的第一步。我国海岸线绵长, 滩涂广泛分布于中国沿海沿岸^[12]。由于人类对潮间带的不合理开发利用以及生产、生活废水的任意排放, 滩涂生态系统的健康和稳定受到严重威胁, 因此对滩涂进行深入研究具有重要意义。

1.2 底栖微型真核生物研究简介

底栖微型真核生物 (Benthic Microeukaryotes) 指生活史的大部分或全部时间在沉积物生活的单细胞真核生物, 主要指底栖原生生物^[13], 包括底栖原生动物和底栖真核微藻等。其中底栖原生动物又主要包括纤毛虫、肉足虫和鞭毛虫等单细胞真核生物。潮间带沉积物中孕育着种类繁多, 丰度、生物量高的底栖微型真核生物^[14-16]。底栖微藻作为重要的初级生产者, 为底栖原生动物提供食物, 也可通过再悬浮为水体中的原生动物提供食物, 还可对水-底界面的物质交换具有一定的贡献^[17]。穆文华等^[17]基于显微镜镜检技术和高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, 简称 HPLC 技术) 对厦门潮间带的底栖微藻进行的研究表明硅藻是底栖微藻的主要类群, 甲藻、金藻等亦有分布; 采样时间和底质类型不同, 底栖微藻的种类组成和优势属差异显著。底栖原生动物中的纤毛虫、鞭毛虫等作为底栖食物网中重要的中间环节, 可摄食细菌、微藻同时被后生动物或其它原生动物摄食, 在底栖生态系统的物质循环和能量流动过程中扮演着重要的角色^[18-20]。杜永芬等^[21]采用硅胶 (Ludox) 提取结合定量蛋白银染色 (Quantitative protargol stain, QPS) ^[22,23] 对大沽河潮间带沉积物中底栖纤毛虫进行的定量研究表明, 纤毛虫丰度和生物量存在季节差异性, 同时呈现出随深度增加而减少的现象。代仁海等^[18]使用 Ludox-QPS 法对青岛潮间带沉积物中的底栖纤毛虫的研究亦表明纤毛虫丰度在潮间带存在时空差异, 且观测到纤毛虫丰度的极高值。

基于显微镜鉴定技术对底栖微型真核生物的研究往往仅局限在对特定类群 (如底栖纤毛虫、底栖微藻) 进行研究, 鲜有研究利用该技术对底栖微型真核生物多样性进行较全面的研究。首先, 沉积物组成复杂^[24,25] (含有不同粒径的颗粒和成分复杂的有机质) 不利于对底栖微型真核生物的鉴定; 其次, 底栖微型真核生物种类繁多、形态各异, 不同底栖微型真核生物类群保存、鉴定过程和依据各不相同^[26-28]; 最后, 底栖微型真核生物中部分类群因体积微小 (如 picoeukaryotes, 微型真核生物^[29,30]) 或形态特征不明显 (如变形虫) ^[31,32] 而鉴定困难。

沉积物中核酸提取技术和基于核酸的分子分类学技术的不断发展和应用^[33-36], 大大推进了对底栖微型真核的研究。尽管如此, 相对于水体中微型真核生物的研究 (淡水或海水, 小尺度或全球尺度) ^[37-40], 利用分子分类学技术对沉积物中微型真核生物的研究较少^[41-43]。Yu 等^[44]结合变性梯度凝胶电泳 (Denatured

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库