

DOI: 10.5846/stxb201401260195

王丽娜,余正,田野,张文静,杨军. 基于克隆文库技术分析瘤棘砂壳虫的食物组成. 生态学报 2015, 35(18): 6183-6188.

Wang L N, Yu Z, Tian Y, Zhang W J, Yang J. Diet composition of *Diffflugia tuberspinifera* (testate amoeba) based on a clone library technique. Acta Ecologica Sinica 2015, 35(18): 6183-6188.

## 基于克隆文库技术分析瘤棘砂壳虫的食物组成

王丽娜<sup>1</sup>\*, 余正<sup>1</sup>\*, 田野<sup>1</sup>\*, 张文静<sup>2</sup>, 杨军<sup>1</sup>\*,

1 中国科学院城市环境研究所, 城市环境与健康重点实验室, 水生态健康研究组, 厦门 361021

2 厦门大学海洋与地球学院, 厦门 361102

3 中国地质大学(武汉)环境学院, 武汉 430074

4 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 瘤棘砂壳虫是东亚特有的原生动物, 广泛分布于长江与珠江中下游以及福建地区的湖泊和水库, 作为水生态系统的捕食者, 在维持水生态系统的结构与功能方面发挥着重要作用。利用 18S rRNA 基因 PCR 扩增和克隆文库测序等分子生物学技术方法, 从基因水平研究瘤棘砂壳虫的食物组成。结果表明: 所获得的 46 条序列在 97% 相似度水平含有 11 类 OTUs (Operational taxonomic units, 操作分类单元), 其中包括轮虫 6 个, 桡足类 5 个, 说明瘤棘砂壳虫的捕食类群以轮虫和桡足类为主, 同时也证明单细胞生物可以直接以多细胞的后生动物为食。此外, 通过克隆文库测序技术分析原生动物的食物组成比例, 不仅是一种方便、高效、快速、重复性高的方法, 同时也为分析原生动物的生态功能提供了一种新的视角。

**关键词:** 18S rRNA 基因; 克隆文库; 砂壳虫; 捕食; 原生动物

## Diet composition of *Diffflugia tuberspinifera* (testate amoeba) based on a clone library technique

WANG Lina<sup>1</sup>\*, YU Zheng<sup>1</sup>\*, TIAN Ye<sup>1</sup>\*, ZHANG Wenjing<sup>2</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>\*,

1 Aquatic EcoHealth Group, Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

2 College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

3 School of Environmental Studies, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** *Diffflugia* is a morphologically diverse genus of the free-living shelled amoeboid protozoa that are important components of freshwater ecosystems and play crucial roles in nutrient cycles and energy flow through food webs. *Diffflugia tuberspinifera* is an endemic species of East Asia and is widely distributed in freshwater lakes and reservoirs in China. Clearly, this species plays a critical role in maintaining the structure and function of freshwater ecosystems. However, little is known about its diet composition and predatory behavior at both species and gene levels. This testate amoeba (*D. tuberspinifera*) was first found in the Wujiang River, Guizhou Province, China. Subsequently, more detailed studies on its morphology and biometry have been done on natural populations from Yangtze River and Pearl River valleys, and Fujian reservoirs. Recently, Han et al. illustrated that *D. tuberspinifera* is an active and agile hunting carnivore that can capture swimming prey including micro-particulates, rotifers, and other metazoans. In previous studies, however, the specimen identifications were done by microscopic examination, which requires a broad and deep taxonomic knowledge and is very

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172114, 30800097); 福建省杰出青年科学基金项目(2012J06009)

收稿日期: 2014-01-26; 网络出版日期: 2014-11-19

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jyang@iue.ac.cn

<http://www.ecologica.cn>

laborious , time-consuming , and somewhat variable because of insufficient taxonomic resolution. In order to facilitate the identification of diet composition in *D. tuberspinifera* , an inexpensive , efficient , rapid and easy-to handle gene clone library has been developed for diet detection and analysis. The plankton samples were collected from the Hubian Reservoir in Xiamen city in September of 2010. Individual cells were isolated using a glass capillary under an inverted microscope and washed 3—5 times with distilled water before DNA extraction and PCR amplification. The 18S rRNA gene was amplified by the universal eukaryotic primers , and the purified PCR products were ligated into the pGEM-T vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -competent cells. In total , 46 plasmids containing target gene fragments were successfully identified and sequenced. Each sequence was compared with sequences available in the GenBank database using BLAST , and the closest relatives were identified for diet or food composition analysis. Finally , 11 OTUs ( operational taxonomic units) were identified at 97% sequence similarity level , and they belonged to either Rotifera ( 52%) or Copepoda ( 48%) . Our results , combined with existing data , suggested that: 1) the diet composition of *Diffugia tuberspinifera* is composed of both rotifera and copepoda species; 2) unicellular protozoa are not only the food of metazoa , but they can also prey on multicellular micro-metazoa; 3) molecular methods are universally applicable , and the SSU rRNA ( small subunit ribosomal RNA) gene clone library is an efficient , rapid , and repeatable approach to study the diet composition of protozoa.

**Key Words:** 18S rRNA gene; clone library; *Diffugia*; predation; prozotoa

砂壳虫 (*Diffugia*) 广泛分布于世界各地 , 是淡水生境中丰度和多样性最高的有壳虫原生动动物 , 特别是在湖泊水库物质循环和能量流动等关键生态过程中发挥重要的作用。然而 , 长期以来对有壳虫食性了解极为有限 , 并且以往的研究主要限于显微镜观察 , 认为其主要以藻类和真菌为食物<sup>[1]</sup>。瘤棘砂壳虫 (*Diffugia tuberspinifera*) 是东亚特有的淡水自由生原生动动物 , 首次在中国贵州乌江渡被发现<sup>[2]</sup> , 虫体大小 100—120  $\mu\text{m}$  , 广泛分布于我国长江与珠江中下游以及福建地区的湖泊和水库中<sup>[3-6]</sup>。近年来 , 韩博平等<sup>[6-7]</sup>首次报道瘤棘砂壳虫以摄食水中的微小颗粒及轮虫为主 , 说明单细胞生物可以捕食多细胞的后生浮游生物。事实上 , 原生动动物是经典食物链与微食物网的关键连接点 , 因此 , 在维持水生态系统结构、功能等方面具有重要的地位和意义<sup>[8]</sup>。

目前国际学者对砂壳虫的研究重点聚焦于形态学、分类学、生态学、系统发育等方面。杨军等<sup>[3, 9]</sup>综合运用现代分类学技术方法对瘤棘砂壳虫进行了系统分类描述 , 利用 X 射线能谱仪分析淡水瘤棘砂壳虫壳体元素 , 发现其壳体化学元素组成介于海洋和土壤有壳虫之间; Wanner 等<sup>[10]</sup>通过形态计量学方法 , 揭示了有壳虫适应不同环境的各种机制; Gomaa 等<sup>[11]</sup>基于 SSU rRNA 基因序列在分子水平上进一步确定砂壳虫系统发育地位。韩博平等<sup>[6]</sup>基于显微观察首次发现瘤棘砂壳虫能够捕食轮虫 , 这些研究结果都为砂壳虫捕食特性的研究奠定了一定的基础。近几年 , 在福建多个水库中发现大量瘤棘砂壳虫 , 为了更清楚地了解瘤棘砂壳虫的捕食习性和食物组成 , 首次尝试将分子生物学技术引入到砂壳虫食物组成的研究中。本研究采用构建克隆文库的分子生物学方法分析砂壳虫食物组成。通过采集样品 , 分离活体瘤棘砂壳虫 , 对总 DNA 提取 , 设计 18S rRNA 基因特异引物 , 构建克隆文库并进行有效序列的分析 , 进而分析食物的物种组成。此方法操作简单 , 试验周期短 , 重复性好 , 为研究砂壳虫摄食行为特点提供了新的研究手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2010 年 9 月在厦门市湖边水库 ( 24°30'N , 118°09'E) 水体表层水平及垂直方向上利用网孔直径为 64  $\mu\text{m}$  的浮游生物网拖拽捞取样品 , 将水样转入 50 mL PVC 瓶 , 并快速送至实验室。在倒置显微镜下挑取瘤棘砂壳虫虫体 , 超纯水清洗体表 3—5 次 , 以避免外源 DNA 的污染。选取 50 个个体装入 1.5 mL 的无菌离心管中。置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存 , 以备进行总 DNA 提取。

## 1.2 DNA 提取

配制异硫氰酸胍法 DNA 提取液<sup>[12]</sup> 将瘤棘砂壳虫转移到含有 100  $\mu\text{L}$  DNA 提取液的离心管中, 轻微震荡。混匀后, 置于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅加热 10—30 min 利用无菌枪头破碎虫体。再加入 100  $\mu\text{L}$  异丙醇, 震荡混匀, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中沉淀过夜。次日, 取出冰箱中的样品, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  ,14000 r/min 条件下离心 20 min, 弃上清液。将预冷的 250  $\mu\text{L}$  70% 乙醇加入沉淀物 DNA 中, 混匀漂洗, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  ,14000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液。再加入 250  $\mu\text{L}$  无水乙醇洗涤 DNA, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  ,14000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液。将沉淀物置于无菌处风干 1 min, 加入适量蒸馏水溶解所提取的 DNA, 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

## 1.3 基因的 PCR 扩增及纯化

选择 18S rRNA 基因通用引物 Euk-A (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') 和 Euk-B (5'-TGATCCTTCTGCAGTTCACCTAC-3') 为 PCR 扩增引物<sup>[13]</sup>。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ , 包括 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Ex PCR 缓冲液(10 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  终浓度为 1.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$  dNTP(10 mmol/L) 0.25  $\mu\text{L}$  Ex Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) ,PCR 前后引物各 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 36.75  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 和 2  $\mu\text{L}$  DNA 模板。PCR 反应条件如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 40 个循环为 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s 54  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

PCR 产物用经 EB 染色的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。从凝胶上切下特异性扩增的目的条带, 置于无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 利用凝胶回收试剂盒 (Wizard  $\text{C}$  SV Gel and PCR Clean-up System) 纯化回收 18S rRNA 基因片段。

## 1.4 测序及序列分析

将纯化后的 PCR 产物(18S rRNA 基因) 连接到 pGEM-T 载体, 然后导入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。涂布到含有 50% 氨苄青霉素 (Ampicillin) 的 LB 固体培养基上孵育、培养并进行蓝白斑筛选, 挑取出白色克隆进行 PCR 检测。将正确插入目的片段的 50 个白色克隆样品进行基因测序分析, 应用 DNASTAR 软件对测序结果进行编辑, 去除载体序列。将所获的序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行比对, 挑选与其亲缘关系最相近的已知序列以确定其分类归属。利用 Mothur v. 1.22.2 软件分析操作分类单元 (OTUs, Operational taxonomic units), 按 97% 的相似度进行划分。基于 OTU 结果, 计算 Chao1 值、ACE 值<sup>[14-15]</sup>, 并绘制稀释曲线。

## 1.5 序列登录号

本研究获得的 18S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为: KF910075—KF910085。

## 2 结果

### 2.1 18S rRNA 基因多样性分析

本研究中, PCR 扩增获得的 18S rRNA 基因片段大小约为 1500 bp。对挑选的 50 个阳性克隆进行测序分析, 除 4 个低质量克隆未成功测序外, 共得到 46 条序列。

46 条基因序列在 97% 相似度水平归为 11 类 OTU (图 1)。多样性指数 Chao1 值为 32, ACE 指数为 74。其中, OTU1 及 OTU2 丰度最高, 各自包含了 12 条序列, 表明 OTU1 及 OTU2 在砂壳虫体内丰度较高 (图 2)。OTU3 是 8 条序列, OTU4 有 7 条序列。其他 7 个 OTU 均包括 1 条序列, 相对丰度较低。

### 2.2 食物组成

基于系统发育地位分析表明, 所有 OTUs 均可划归为两大类浮游动物: 52% 的 OTUs 序列属于轮虫 (Rotifera) 48% 的 OTUs 序列是桡足类 (Copepoda) 的哲水蚤 (表 1, 图 3)。其中 6 个 OTUs 属于轮虫, 包括 24 条序列; 5 个 OTUs 属于桡足类, 包括 22 条序列。由表 1 可知, 轮虫主要种类包括矩形龟甲轮虫 (*Keratella quadrata*)、对壶状臂尾轮虫 (*Brachionus urceolaris*)、大肚须足轮虫 (*Euchlanis dilatata*)、方块鬼轮虫 (*Trichotria tetractis*)、萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*)、剪形巨头轮虫 (*Cephalodella forficula*); 桡足类包括 *Mastigodiptomus nesus* (镖水蚤科一种)、拟细真镖水蚤 (*Eudiaptomus graciloides*)、*Eudiaptomus gracilis* (镖水蚤科一种)、*Skistodiptomus oregonensis* (镖水蚤科一种)、*Leptodiptomus moorei* (镖水蚤科一种)。以上结果提示,

瘤棘砂壳虫体内出现轮虫及桡足类的 18S rRNA 基因,推测瘤棘砂壳虫不仅以轮虫为食,而且可以捕食桡足类。

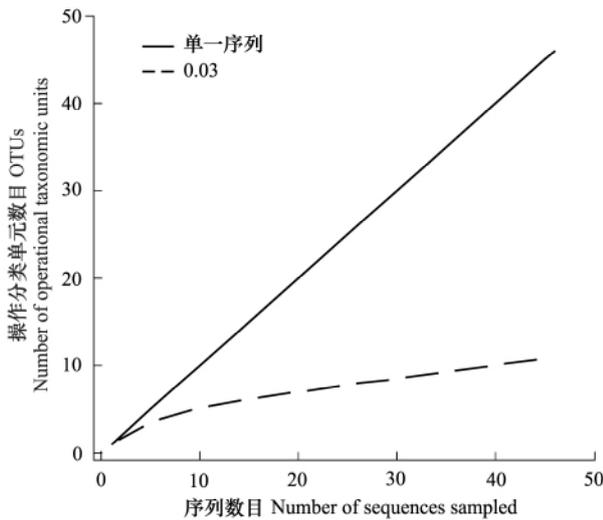


图1 18S rRNA 基因序列稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves for 18S rRNA gene sequences

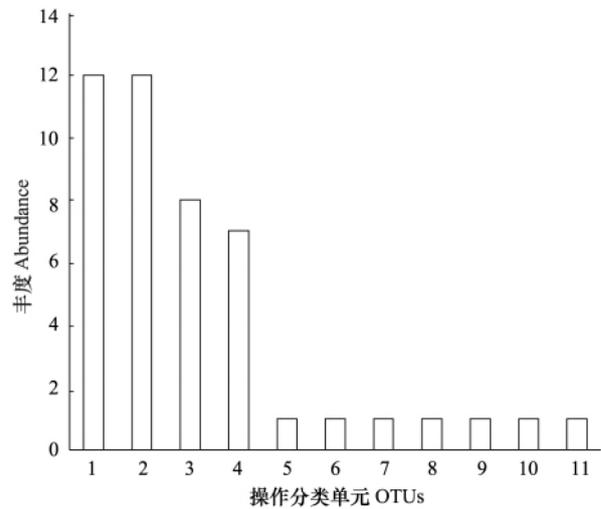


图2 18S rRNA 基因克隆文库中 OTU<sub>0.03</sub> 等级丰度

Fig. 2 Rank-abundance distribution of OTU<sub>0.03</sub> based on 18S rRNA gene clone library

表1 18S rRNA 基因测序条带序列系统发育地位

Table 1 Phylogenetic affiliations of 18S rRNA gene sequences from clone library

操作分类单元 Operational taxonomic units, OTUs	序列登录号 Accession number	分类类群 Taxon	序列最相似物种(序列登录号) Closest relative (accession number)	相似度/% Similarity
1	KF910075	Rotifera	<i>Keratella quadrata</i> (DQ297697)	99
2	KF910076	Copepoda	<i>Mastigodiatomus nesus</i> (AY339156)	99
3	KF910077	Rotifera	<i>Brachionus urceolaris</i> (DQ089734)	99
4	KF910078	Copepoda	<i>Eudiaptomus graciloides</i> (AY339149)	99
5	KF910079	Rotifera	<i>Euchlanis dilatata</i> (AY218116)	93
6	KF910080	Copepoda	<i>Eudiaptomus gracilis</i> (AY339148)	94
7	KF910081	Copepoda	<i>Skistodiatomus oregonensis</i> (AY339159)	97
8	KF910082	Rotifera	<i>Trichotria tetractis</i> (DQ297724)	97
9	KF910083	Rotifera	<i>Brachionus calyciflorus</i> (DQ297692)	95
10	KF910084	Copepoda	<i>Leptodiatomus moorei</i> (AY339154)	93
11	KF910085	Rotifera	<i>Cephalodella forficula</i> (DQ297693)	95

### 3 讨论

#### 3.1 瘤棘砂壳虫的食物组成

基于显微镜观测的研究表明,瘤棘砂壳虫属肉食性动物,会攻击其周围任何微小的生物,尤其是大小相近的微型生物,主要摄食以轮虫为主的浮游生物,包括胶鞘轮虫、独角聚花轮虫、螺形龟甲轮虫、红多肢轮虫、奇异六腕轮虫、对棘异尾轮虫,以及无节幼体<sup>[6-7,16]</sup>。瘤棘砂壳虫的捕食行为主要依赖伪足,伪足可以自由伸缩<sup>[17]</sup>,并且可以准确判断所要捕食对象的位置。在广东流溪水库轮虫中,胶鞘轮虫和独角聚花轮虫容易被瘤棘砂壳虫摄食,因为它们身体柔软、游泳速度慢;而龟甲轮虫、红多肢轮虫的外壳硬,游泳速度快,不易被瘤棘砂壳虫捕食<sup>[7,16]</sup>。针对不同轮虫物种,瘤棘砂壳虫的捕食方式是不一样的。如遇到身体柔软的胶鞘轮虫,瘤棘砂壳虫一般会攻击它们的背部或尾部,容易捕食成功;而对于外壳比较硬的龟甲轮虫,选择先攻击它们的口部,捕食成功率较低<sup>[6,16]</sup>。毫无疑问,我们的结果也进一步表明,作为单细胞的瘤棘砂壳虫能够捕食多细胞

的后生动物(表 1)。

有趣的是除了瘤棘砂壳虫体内检测到轮虫 18S rRNA 基因序列外,还检测到相当比例的桡足类,进而证明湖边水库瘤棘砂壳虫主要以轮虫及桡足类为食。本研究检测到瘤棘砂壳虫捕食的轮虫及桡足类种属与韩博平等<sup>[6-7,16]</sup>学者观察到的物种有所差异,推测这与不同生境及被捕食物种的丰富度相关。同时,本研究进一步补充扩展了瘤棘砂壳虫捕食对象的范围。由于桡足类的个体相对于瘤棘砂壳虫要大很多,所以捕食相对较难。最近,韩博平等<sup>[16]</sup>观察到瘤棘砂壳虫可以捕食其周围死亡的桡足类,但关于活体桡足类的捕食尚未见报道。不过,本文推测瘤棘砂壳虫能够捕食桡足类幼体,因为桡足类幼体个体相对较小,并且经历的幼体阶段相对较长。

事实上,瘤棘砂壳虫还会捕食藻类,包括甲藻、丝状藻类等<sup>[6]</sup>。但在本研究中没有检测到藻类,这并不代表瘤棘砂壳虫没有捕食藻类。究其原因,一方面可能是我们所用的 18S rRNA 基因引物具有一定特异性,扩增序列产生一定的偏好性,导致没有检测到藻类。另一方面,瘤棘砂壳虫捕食的其他类食物数量不够多,或者已经消化掉了,低于检测线,因而也没能检测到。未来的深入研究有必要筛选更合适的 PCR 扩增引物和优化 PCR 条件。

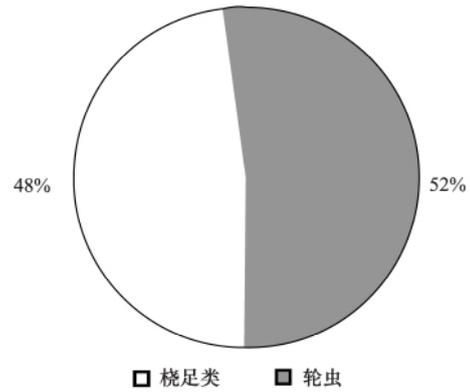


图 3 18S rRNA 基因克隆文库的物种分类组成 (n = 46)  
Fig. 3 Relative abundance of different taxonomic groups based on 18S rRNA gene clone library (n = 46)

表 2 显微观察方法与分子技术手段的比较

Table 2 Comparison of traditional microscopic method and molecular biology technology

方法 Method	显微观察 <sup>[6-7,16]</sup> Microscopic method <sup>[6-7,16]</sup>	分子方法(本研究) Molecular method (this study)
物种组成 Species composition	轮虫(胶鞘轮虫、聚花轮虫、龟甲轮虫、多肢轮虫、六腕轮虫、异尾轮虫); 桡足类(桡足类幼体)	轮虫(龟甲轮虫、臂尾轮虫、鬼轮虫、须足轮虫、巨头轮虫); 桡足类(哲水蚤镖水蚤科 5 种)
优点 Advantages	可直观的观察捕食过程; 能分辨所捕食生物的死活	高效、可获得较高的物种多样性; 快速、实验周期短; 方便、易设置重复试验; 对分类学知识要求不高
缺点 Disadvantages	观察捕食行为耗时长,实验周期长; 需要分类学背景的专业人才; 受半透明壳体的影响,对于体内食物观察困难; 一些不完整的虫体难于进行物种鉴定	一些引物具有偏好性; 不能直观的观察捕食过程; 不能区分所捕食生物的死活

### 3.2 基因克隆文库技术是一个有效的食物组成分析方法

传统的单细胞生物食物组成和捕食行为研究主要是利用显微活体观察技术,在观察时需要具有分类学背景的专业人才,处理大量样本耗时较长,因此分析周期长<sup>[18]</sup>。而近年来兴起的分子生物学技术方法的方便、高效、快速,弥补了活体观察的这一缺陷。本研究中,利用 18S rRNA 基因序列克隆文库的分子生物学技术手段,能够发现瘤棘砂壳虫体内含有轮虫及桡足类的基因序列,证明此方法可行可信。因此,单细胞原生动物体内 18S rRNA 基因的检测可以作为一个有用的工具来快速地分析瘤棘砂壳虫的食物组成。虽然分子生物学技术手段能够快速检测食物组成,但不能直观地观测其捕食行为过程,因此要配合显微镜活体观察来共同研究瘤棘砂壳虫的捕食特征(表 2)。

为进一步深入全面认知瘤棘砂壳虫的捕食行为特征,揭示其在水生态系统结构、功能等方面的重要作用和意义,建议后续研究综合显微活体观察与分子生物学方法,达到技术方法上相互补充的效果。

## 参考文献(References):

- [1] Meisterfeld R. Order Arcellinida Kent, 1880 // Lee J J, Leedale G F, Bradbury P. An Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd ed. Lawrence, USA: Allen Press, 2002: 827-860.
- [2] 胡东利, 沈韞芬, 顾曼如, 龚循矩. 武陵山地区原生动物的新种和新纪录 // 宋大祥. 西南武陵山地区无脊椎动物. 北京: 科学出版社, 1997: 40-72.
- [3] Yang J, Beyens L, Shen Y F, Feng W S. Redescription of *Diffflugia tuberspinifera* Hu, Shen, Gu et Gong, 1997 (Protozoa: Rhizopoda: Arcellinida: Difflogiidae) from China. Acta Protozoologica, 2004, 43(3): 281-289.
- [4] 刘乐冕, 杨军, 张文静, 余正. 原生动物的瘤棘砂壳虫六个自然种群的形态计量学分析. 动物学研究, 2010, 31(4): 435-443.
- [5] Yu Z, Zhang W J, Liu L M, Yang J. Evidence for two different morphotypes of *Diffflugia tuberspinifera* from China. European Journal of Protistology, 2014, 50(2): 205-211.
- [6] Han B P, Wang T, Lin Q Q, Henri J D. Carnivory and active hunting by the planktonic testate amoeba *Diffflugia tuberspinifera*. Hydrobiologia, 2008, 596(1): 197-201.
- [7] Wang T, Han B P. Food selectivity of *Diffflugia tuberspinifera* in Liuxihe Reservoir, South China. Ecological Science, 2008, 27(5): 398-401.
- [8] 沈韞芬. 西藏高原的原生动物 // 蒋曼治, 沈韞芬, 龚循矩. 西藏水生无脊椎动物. 北京: 科学出版社, 1983: 48-100.
- [9] 杨军, Beyens L, 沈韞芬, 冯伟松. 瘤棘砂壳虫(肉足亚门:根足总纲)壳体元素组成. 动物学研究, 2004, 25(5): 452-455.
- [10] Wanner M. A review on the variability of testate amoebae: methodological approaches, environmental influences and taxonomical implications. Acta Protozoologica, 1999, 38(1): 15-29.
- [11] Gomaa F, Todorov M, Heger T J, Mitchell E A D, Lara E. SSU rRNA phylogeny of Arcellinida (Amoebozoa) reveals that the largest Arcellinid Genus, *Diffugia* Leclerc 1815, is not monophyletic. Protist, 2012, 163(3): 389-399.
- [12] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987, 162(1): 156-159.
- [13] Medlin L K, Elwood H J, Stickel S, Sogin M L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene, 1998, 71(2): 491-499.
- [14] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 1-11.
- [15] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [16] Han B P, Wang T, Xu L, Lin Q Q, Zhang J Y, Dumont H J. Carnivorous planktonic *Diffflugia* (Protista, Amoebozoa, Testacea) and their predators. European Journal of Protistology, 2011, 47(3): 214-223.
- [17] 张文静, 杨军, 田野. 有壳肉足虫的结构、运动以及生殖. 生物学通报, 2010, 45(1): 12-14.
- [18] Gilbert D, Mitchell E A, Amblard C, Bourdier G, Francez A J. Population dynamics and food preferences of the testate amoeba *Nebela tinctoria major-bohemica-collaris* complex (Protozoa) in a *Sphagnum* Peatland. Acta Protozoologica, 2003, 42(2): 99-104.