J. Lake Sci.(湖泊科学),2011,**23**(3):469-478
http://www.jlakes.org. E-mail:jlakes@niglas.ac.cn
© 2011 by *Journal of Lake Sciences*

太湖不同湖区水生真菌多样性*

宣淮翔[1],安树青[2],孙庆业[1]**,周长芳[2]
(1:安徽大学生命科学学院,合肥 230039)
(2:南京大学生命科学学院,南京 210093)

摘　要:采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)的方法,研究太湖不同湖区水体及沉积物中的水生真菌多样性及环境因子对其的影响.结果表明,2009 年 5 月份太湖水生真菌群落具有较为丰富的多样性组成.东半湖水生真菌多样性指数较西半湖高,湖心区最低.不同湖区水生真菌群落的遗传结构和主要类群组成存在空间差异,东半湖真菌类群较多,湖心区最少.系统发育分析显示太湖水生真菌优势类群主要归属于真菌界的子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota),包含 8 个目,分别占所有序列的 57.7% 和 26.9%,它们在不同湖区均有分布.经检测发现卵菌纲(Oomycetes)水霉目(Saprolegniales)一种,仅存在于东太湖水体中;沉积物中的特有真菌类群主要归属于壶菌门(Chytridiomycota)和接合菌门(Zygomycota).这些具有空间分布差异的类群约占所有序列的 15.4%.聚类及典型相关分析表明,太湖不同湖区水生真菌多样性存在差异,这与湖区间不同的营养水平、风浪扰动状况等因素有关.
关键词:水生真菌;多样性;PCR-DGGE;太湖

Diversity of aquatic fungi in different areas of Lake Taihu

XUAN Huaixiang[1], AN Shuqing[2], SUN Qingye[1] & ZHOU Changfang[2]
(1: *School of Life Science*, *Anhui University*, *Hefei* 230039, *P. R. China*)
(2: *School of Life Science*, *Nanjing University*, *Nanjing* 210093, *P. R. China*)

Abstract: Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) was applied to analyze the diversity of aquatic fungi in the water and sediment of Lake Taihu. The results indicated that the diversity of aquatic fungi community in Lake Taihu is highest on May, 2009. The fungi diversity indexes in the west region of the lake were lower than those in the east region, and the fungi diversity indexes in the center region of the lake were the lowest. Aquatic fungal genetic structure and community composition of major groups had spatial difference in different areas of Lake Taihu. The fungal groups in the east of lake were more than those in the west, and the groups in the center of lake were the least. Phylogenetic analyses mainly placed the majority of the aquatic fungi in Lake Taihu within two fungal phyla, Ascomycota and Basidiomycota, which contained 8 fungal orders, accounted for 57.7% and 26.9% of the sequences, respectively. The fungi, which were only found in the water of East Lake Taihu, belonged to Saprolegniales of Oomycetes and those, which were only found in the sediment, belonged to Chytridiomycota and Zygomycota. These groups, which had differences in the vertical distribution, accounted for 15.4% of the sequences. Cluster analysis and Canonical Correlation analysis showed that fungal diversity had spatial differences in Lake Taihu. The differences were related to different nutrient levels, wave disturbances and other factors.
Keywords: Aquatic fungi; diversity; PCR-DGGE; Lake Taihu

水生真菌是湖泊食物网的重要组成部分,对淡水生态系统的物质循环和能量流动起着重要作用[1].它们主要参与有机物的分解并把有机物矿化成能被植物用来进行初级生产的无机化合物,但由于它们体积微小等原因,在自然生态系统中还很少被了解.

---

* 国家重点基础研究发展计划项目(2008CB418004)资助.2010-09-02 收稿;2010-10-27 收修改稿.宣淮翔,男,1986 年生,硕士研究生;E-mail:xhx8618@163.com.
** 通讯作者;E-mail: sunqingye1964@yahoo.com.cn.

太湖作为我国第三大淡水湖泊,是典型的浅水湖,目前富营养化程度不断加深.蓝藻水华频繁暴发,水质日益恶化,生态系统已遭到严重破坏.在自然界中,微生物与环境之间是彼此影响,相互依存的.在湖泊生态系统中,水体营养物质的数量或种类的改变,皆能导致水体微生物多样性的改变[2].因此,微生物多样性常被用作监测和预测一个水生态系统健康与否的标准.

已有研究证实,自然界中有85%-99.9%的微生物至今还不可纯培养[3],因而以此为前提的传统形态学分类方法的使用受到了限制.尽管已有很多研究者意识到水生真菌的重要作用,但是由于传统分离、培养、鉴定方法的局限,对于其群落结构及物种组成仍知之甚少[4].与传统的研究方法相比,分子生物学技术在揭示生态系统中微生物群落组成及系统发育关系方面具有独特的优势.最近十多年来,研究主要集中在海洋生态系统[1,5]及淡水湖泊[6]中水生真菌的种类与功能,人们已开始在分子水平上深入研究包括水生真菌在内的微型真核微生物[7-8].变性梯度凝胶电泳(DGGE)作为常用的分子技术,目前已被广泛应用于研究自然生态系统中的微生物群落组成.已有学者对太湖水体浮游细菌组成[9]及对富营养化的响应[10]、微型真核微生物遗传多样性[11]及对蓝藻水华的响应[12]、沉积物可培养细菌多样性[13]以及其太湖流域土壤的微生物群落结构[14]等进行了相关研究,但是对于太湖不同湖区水生真菌群落多样性的研究较少.由于水生真菌种类繁多,代谢能力强,生命活动过程复杂,与水体中的动植物有着非常复杂的生态关系,并在生物体的降解中起着重要作用[15],因而对于太湖水生真菌群落结构和多样性进行解析有助于我们更为深入地掌握太湖微生物的分布特征及其在淡水生态系统中的功能与作用,并且可以为优化微生物群落结构、调节群落功能和发现新的重要功能类群提供可靠的生物学依据.

本实验采用PCR-DGGE方法对太湖不同湖区水生真菌多样性进行研究,探究水生真菌在太湖中的分布特征以及不同湖区水体营养水平与水生真菌群落多样性的关系,以期为富营养化湖泊的生物监测和生物修复技术的应用提供微生物学依据.

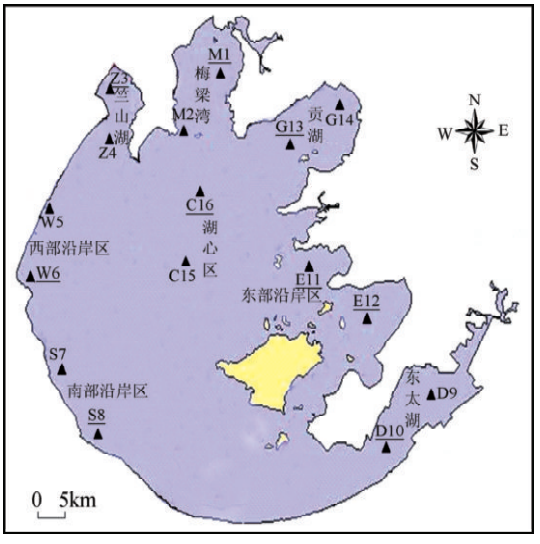


图1 太湖采样点分布

Fig. 1 Sampling sites in Lake Taihu

1 材料与方法

1.1 样点描述和采样方法

于2009年5月分别在太湖西半湖的梅梁湾(M1, M2)、竺山湖(Z3, Z4)、西部沿岸区(W5, W6)、南部沿岸区(S7, S8);东半湖的东太湖(D9, D10)、东部沿岸区(E11, E12)、贡湖(G13, G14);湖心区(C15, C16)采集样品(图1),点位描述见表1.用分层水质采样器取表层和底层水混合,取200ml湖水,用20μm的筛网预过滤,去除大的浮游动物和藻类.然后抽滤到0.22μm的聚碳酸酯膜上,在基因组DNA提取前,滤膜放于-20℃低温冰箱保存.利用彼德森采泥器采集M1、Z3、W6、S8、D10、E12、G13、C16八个点0-10cm表层沉积物样品,取每点的三个平行泥样混合密封好后放入低温保温箱储藏,带回实验室后立即于-20℃冰箱保存.

1.2 不同湖区水质理化性质测定

在取样现场,利用萨氏盘测定水体透明度(SD),便携式pH计测定混合水样pH.所有水体样本的理化性质测定工作均在取样后一周内完成.总氮(TN)的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法,总磷(TP)的测定采用过硫酸钾消解钼酸铵分光光度法[16].

1.3 环境微生物基因组提取

基因组提取按照Zhou等[17]的方法,结合反复冻融和酶解法[18],并进行了改进.把聚集有水体微生物的

0.22μm聚碳酸酯膜剪碎放入2ml的离心管里；直接称取0.5g沉积物样本放入2ml的离心管里. 在装有样品的离心管里加入0.5ml提取缓冲液[0.1mol/L PBS（pH 8.0），0.1mol/L EDTA，0.1mol/L Tris-HCl（pH 8.0），1.5mol/L NaCl，1.0% CTAB]和纤维素酶、蜗牛酶、溶菌酶和蛋白酶K（终浓度分别为6、3、1、1mg/ml），37℃酶解1h，再加入50μl 20%的SDS，225r/min振荡30min后，在-65℃至65℃分别冻融3次，每次30min. 将上述样品处理液以5000r/min离心，10min后收集上清液，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）混匀，10000r/min离心5min后，将上清液转入另一只离心管中，加入等体积的氯仿/异戊醇（24∶1）抽提上清液，10000r/min离心5min后在上清液中加入0.6倍体积异丙醇，4℃过夜沉淀，14000r/min离心15min，弃上清液，70%冰乙醇清洗2次，无菌风吹干，用100μl TE（10mmol/L Tris，pH 7.6，1mmol/L EDTA）缓冲液溶解，得到总DNA的粗提液，置于-20℃保存.

表1 太湖不同湖区采样点基本特征

Tab. 1 Characteristics of sampling sites in different areas of Lake Taihu

湖区分类	湖区位点	性状描述	经纬度
西半湖	M1	梅梁湾航道附近，无水草分布	31°28′35″N，120°11′40″E
	M2	少量蓝藻悬浮，岸边有芦苇	31°24′24″N，120°08′45″E
	Z3	零星水草，蓝藻悬浮	31°27′00″N，120°01′41″E
	Z4	零星水草，蓝藻悬浮	31°23′51″N，120°01′55″E
	W5	大浦河入湖，航道附近，无水草分布	31°18′52″N，119°56′42″E
	W6	无水草分布，少量蓝藻悬浮	31°13′44″N，119°53′41″E
	S7	附近岸边有芦苇	31°06′28″N，119°58′02″E
	S8	无水草分布，少量蓝藻悬浮	31°02′00″N，120°02′22″E
东半湖	D9	草型湖区，马来眼子菜-野菱分布	31°05′22″N，120°30′48″E
	D10	荇菜-野菱-茭草-狐尾藻分布	31°01′18″N，120°27′14″E
	E11	大量马来眼子菜分布	31°14′41″N，120°19′53″E
	E12	荇菜-马来眼子菜分布	31°10′37″N，120°24′21″E
	G13	少量马来眼子菜分布	31°23′11″N，120°17′43″E
	G14	少量菹草、马来眼子菜分布	31°26′06″N，120°22′37″E
湖心区	C15	太湖中心，未见水草	31°14′53″N，120°10′14″E
	C16	零星水草，有蓝藻悬浮	31°20′18″N，120°10′49″E

1.4 水生真菌28S rDNA-PCR扩增

采用对大多数真菌28S rDNA基因具有特异性的真菌通用引物U1和U2-GC[19]对样品总DNA的粗提液进行PCR扩增，上游引物U1 5′-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3′，下游引物U2 5′-GACTCCTTGGTCCGTGTT-3′，为了稳定扩增片段在DGGE过程中的解链行为，需在U2的5′端加上一条长40bp富含GC的序列：5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3′. 扩增目的产物为真菌28S rDNA上从403-662bp的一段260bp的序列. 50μl的反应体系，其组分为：ddH_2O 37.5μl，10×PCR buffer（含Mg^{2+}）5μl，10mmol dNTP 1μl，10pmol的上下游引物各2μl，0.5μl Taq酶（5U/μl），模板1-10ng. 扩增条件为：94℃预变性3min；94℃变性1min，54.8℃退火40s，72℃延伸1min，35个循环，最后72℃延伸10min.

1.5 DGGE分析

DGGE采用D-Code system（Bio-Rad，USA），8%聚丙烯酰胺凝胶，变性梯度为45%-70%（100%变性相当于7mol/L尿素和40%去离子甲酰胺），PCR产物进样量为30μl（800ng）. 电泳条件为：60℃，1×TAE（40mmol/L Tris，20mmol/L冰乙酸，1mmol/L Na_2-EDTA，pH 7.4），100V电压，进行16h. 电泳结束后用20ml SYBR Green I核酸染料（Sigma）（1×TAE稀释10000倍）染色30min，经Bio-Rad凝胶成像系统拍照，利用凝胶图像处理软件Quantity One分析样品电泳条带的数目和强度，分析过程主要采用轨迹定量法进行自动定量，评估不同样品的真菌群落多样性. 在每个样品泳道上，只有当条带的光强度大于该泳道上最亮条带的5%才作为统计条带. 用香农-威纳指数（Shannon-Wiener index）来计算真菌物种多样性，其计算原理是把每一个单独的条带看做一个单独菌群，并且该条带的强度看做该菌群的丰度[20]. 计算公式为：

$$H = -\sum_{i=1}^{S} p_i \ln p_i,\ p_i = N_i/N$$

式中,H 为样品中水生真菌的香农-威纳指数,S 为丰富度,N_i 为样品 DGGE 图谱中第 i 条带强度,N 为该样品条带总强度,p_i 为第 i 条带强度占该样品条带总强度的比率.

1.6 克隆测序及构建系统发育树

用刀片切下代表优势类群的独立条带,放入 1.5ml 离心管中,加入 50μl TE,放置 4℃冰箱过夜洗脱其中的 DNA 片段. 用 2μl 悬液作为模板进行 PCR 扩增,采用同上扩增程序,引物为 U1 和 U2. PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖电泳检测,琼脂糖割胶纯化 PCR 产物,用 TA 克隆试剂盒 pEASY-T1-Vector(Transgen 产品)构建克隆文库. 用蓝白斑氨苄抗性法筛选阳性克隆,挑取若干白斑摇菌,再用测序引物 M13F、M13R 进行菌液 PCR 验证,确证有目的片段插入后,送菌液至上海生工测序. 测序结果在 GenBank 数据库中使用 BLASTn 工具进行比对,选择与目的基因序列同源性最高的 28S rDNA 序列作为参照近缘序列. 利用 Mega. 4.0 软件,基于其中邻接(Neighbour-joining)法,构建水生真菌系统发育树. 系统发育树各分枝的置信度经重抽样法(Bootstrap)1000 次重复检测[21].

1.7 统计分析

本文运用了聚类分析和典型相关分析(CCA)分析真菌的群落结构. 利用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱,根据相同迁移率处条带的有无将其转化为二维矩阵,其中 1 代表有条带,0 代表相应迁移距离处没有条带存在. 然后进行非加权组平均法(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means, UPGMA)聚类分析,可得到样品的相似或差异程度. 通过 Canoco for Windows 4.5 多元统计分析软件包将 DGGE 指纹图谱的二维矩阵数据信息先进行除趋势对应分析(Detrended Correspondence Analysis, DCA),由于其物种数据的第一轴梯度长度大于 2,再进行 CCA 分析,将二维矩阵数据信息和水体样本中的环境参数信息进行关联,分析水生真菌多样性与环境因子间的关系.

2 结果与分析

2.1 太湖不同湖区水体参数比较

东半湖 pH 较西半湖偏高;西半湖和湖心区透明度偏低. 总磷和总氮浓度的变化趋势较为相似,西半湖含量明显高于东半湖. 竺山湖 Z3 的总磷浓度最大,为 0.372mg/L,总氮浓度也最大,为 4.798mg/L. 东太湖总氮、总磷含量最低(图 2).

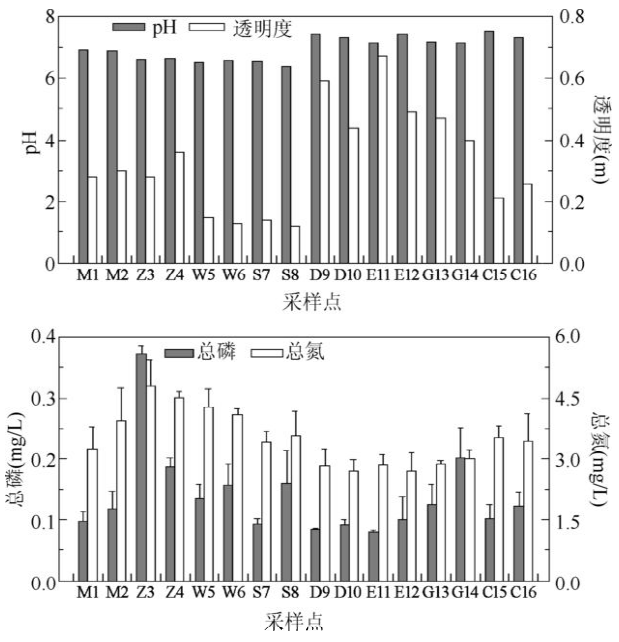


图 2 太湖不同湖区水体样品水质理化参数

Fig. 2 Physico-chemical parameters of water samples in different areas of Lake Taihu

2.2 不同湖区水生真菌群落结构 DGGE 指纹图谱分析

本文对太湖不同湖区样品同时进行总 DNA 提取,经 PCR 扩增,都得到了长度约为 260bp 的 DNA 片段. 对上述各个样品的扩增产物进行 DGGE 分析可以看出,2009 年 5 月太湖八个湖区的 16 个样点分别对应的泳道中均分离出数目不等、位置各异的电泳条带,且不同湖区样品的 DGGE 条带组成存在明显的差异. 以东太湖(D9)和贡湖(G13)的 DGGE 条带数最多,分别为 21、20 条,香农-威纳多样性指数分别为 3.002 和 2.962. 而西部沿岸区(W6)和梅梁湾(M1)条带数较少,分别为 10、8 条,香农-威纳多样性指

数分别为 2.202 和 2.076. 另外，位于湖心区（C15）条带数最少，仅有 6 个条带，香农-威纳多样性指数为 1.589（图 3，图 4）.

聚类分析结果显示，不同湖区内相邻两点的水生真菌组成较为接近；西部沿岸区（W5、W6）与南部沿岸区（S7）的真菌组成在 8 个湖区中最为相近；东太湖（D9）和贡湖（G13）的水生真菌组成也明显聚为一类（图 5）.

2.3 水生真菌群落结构与环境因子的关系

CCA 分析将 DGGE 图谱结果和理化参数结果结合在一起（图 6），分析前先将环境变量的重要性按其单独解释生物数据的方差值的大小排出次序，其解释的显著性进行蒙特卡洛测验（Monie-Carlo test），其中 TN（P = 0.016）、SD（P = 0.008）和 pH（P = 0.016）均具有 95% 以上的置信度，可以对水生真菌物种数据单独解释，而 TP（P = 0.242）虽然也与水生真菌数据相关性较高，但不显著，说明该变量依赖于其他变量，不能独立用于真菌群落组成的解释.

TN、SD、pH 与第一轴典型相关（r = −0.75，r = 0.75 和 r = 0.69），TP 与第二轴典型相关（r = 0.72）（图 6）. 结果表明，水样的理化因子显著影响水生真菌群落组成在图中的排序，TN、TP、SD、pH 对水生真菌群落组成均有较大的关联作用.

2.4 水体与沉积物中水生真菌群落多样性比较分析

太湖 8 个不同湖区水体与对应沉积物中水生真菌的 DGGE 带型具有差异. 水体的条带数目比对应湖区沉积物的条带数目多；不同湖区沉积物水生真菌 DGGE 带型相比，条带数目差异明显. 其中以贡湖区沉积物（G 泥）条带数最多，有 20 条，H 指数为 2.996；而湖心区沉积物（C 泥）条带数最少，仅为 6 条，H 指数为 1.609；西半湖较东半湖沉积物中真菌条带数目高（图 7）.

不同湖区沉积物水生真菌聚类分析结果显示，沉积物中水生真菌的分布具有明显的空间差异性，富营养化水平较高的西半湖三个区（Z、W、S）沉积物真菌组成较为相似，富营养化水平较低的东半湖三个区（D、E、G）聚成一簇；湖心区与梅梁湾的沉积物真菌组成相近（图 8）.

2.5 太湖水生真菌优势类群的系统发育分析

对 2009 年 5 月太湖不同湖区 16 个水样的 DGGE 图谱进行切胶回收，回收条带 20 条（W1 − W20），成功克隆测序获得序列 13 条，获得的真菌核酸序列登录号为 HQ014566 − HQ014578（表 2）；并对太湖 8 个湖区表层沉积物中水生真菌 DGGE 图谱也进行切胶回收，回收条带 20 条（S1 − S20），成功克隆测序获得序列 13 条，获得的真菌核酸序列登录号为 HQ014579 − HQ014591（表 2）.

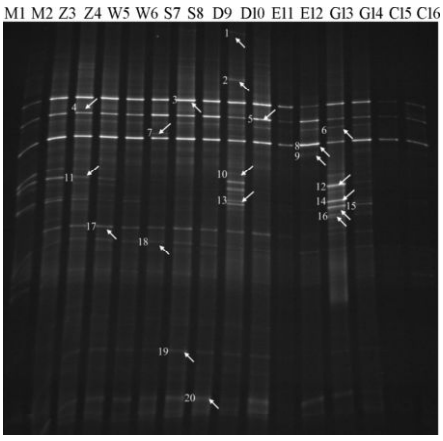


图 3 太湖不同湖区水体样品水生真菌 DGGE 图谱

Fig. 3 Aquatic fungi DGGE fingerprint of water samples in different areas of Lake Taihu

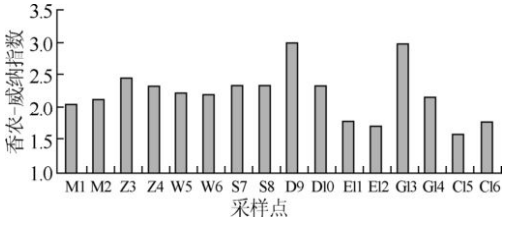


图 4 太湖不同湖区水体样品中水生真菌香农-威纳多样性指数

Fig. 4 Shannon-Wiener index of aquatic fungi of water samples in different areas of Lake Taihu

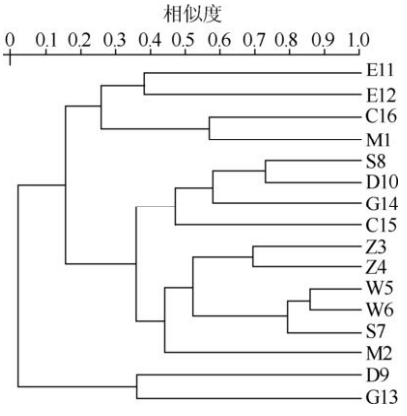


图 5 不同湖区水体样品 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析

Fig. 5 UPGMA cluster analysis of water samples of DGGE fingerprint in different areas of Lake Taihu

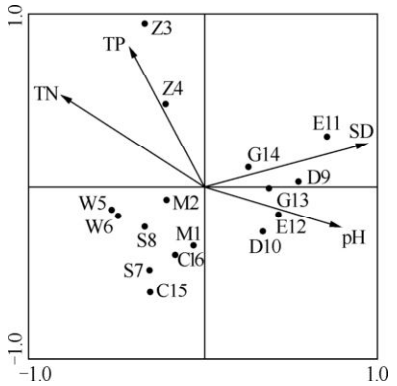


图 6 太湖水生真菌群落组成与环境因子的 CCA 分析结果

Fig. 6 Canonical Correspondence Analysis of aquatic fungi community and environment factors in Lake Taihu

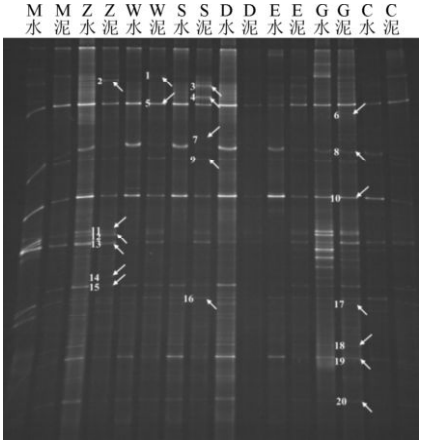


图 7 太湖 8 个湖区水体与对应表层沉积物中水生真菌 DGGE 图谱

Fig. 7 Aquatic fungi of water and sediment DGGE fingerprint in 8 areas of Lake Taihu

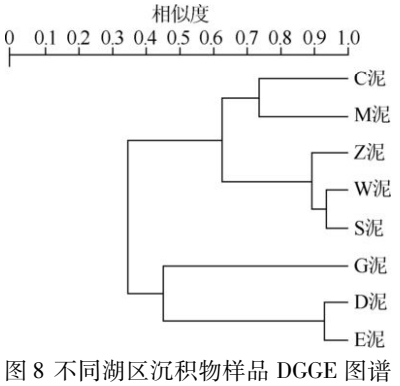


图 8 不同湖区沉积物样品 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析

Fig. 8 UPGMA cluster analysis of sediment samples in different areas of Lake Taihu

共有 26 个特征条带经过切胶回收克隆测序成功获得序列,这些序列在 Genbank 数据库里进行 BLAST,比对结果显示,仅有 12 条序列与数据库中已有的真菌 28S rRNA 基因序列具有较高相似性(95% - 100%),而有 6 条序列(W1、W17、W18、S1、S3、S4)的相似度低于 90%(表 2),这表明太湖水生真菌的基因序列有很多还未被充分研究.

利用 BLAST 比对所得的近缘种序列和 Neighbour-joining 分析,对此 26 条序列进行系统发育分析并构建系统发育树(图 9),结果表明这些序列主要归属于真菌界的子囊菌门(Ascomycota)的 5 个目:格孢菌目(Pleosporales)、柔膜菌目(Helotiales)、粪壳菌亚纲一目(Chaetosphaeriales)、圆盘菌目(Orbiliales)和煤炱目(Capnodiales),共占所有序列的 57.7%;担子菌门(Basidiomycota)中的 3 个目:外担子菌亚纲一目(Malasseziales)、革菌目(Thelephorales)、褐褶菌目(Corticiales),共占所有序列的 26.9%. 另有小部分类群归属于壶菌门(Chytridiomycota)的小壶菌目(Spizellomycetales)、接合菌门(Zygomycota)中的一类未培养接合菌(Uncultured zygomycete)和卵菌纲(Oomycetes)的水霉目(Saprolegniales),这些类群约占所有序列的 15.4%.

3 讨论

3.1 DGGE 在检测水生真菌多样性方面的应用

PCR-DGGE 分子指纹图谱技术目前在微生物分子生态学研究中已被广泛使用[22],尤其是应用在各种生态系统中环境因子变化情况下微生物群落结构的时空差异分析方面[23]. 本文利用真菌 28S rRNA 基因进行 PCR-DGGE 来研究太湖不同湖区水生真菌多样性的变化,避免了传统微生物分离培养法中可培养微生物种类有限的缺点. 然而,尽管这种非培养的分子生物学方法为研究水生真菌群落提供了一条方便可行的途径,但是对于环境样品的 DNA 分析还存在一些缺陷. 由于对于优势类群的分类等级一般只能精确到目或科,缺乏充分的分类学信息,所以很难推测出所检测到的微生物类群的功能. 此外,分子数据的不确定性也可能会影响到结论的得出[24]. 本文利用 DGGE 分析水生真菌多样性,序列比对结果并未发现淡水半知菌[25],可能是由于所选引物偏好性造成. 所以,多对引物联合使用,结合传统的显微镜检和培养法,可以使环境样品的 rDNA 分析更为有效.

3.2 不同湖区水生真菌多样性差异分析

由 DGGE 图谱分析可以发现不同湖区水生真菌多样性存在差异,这可能与不同湖区的营养水平相关.

表 2 DGGE 胶回收条带与近缘种比对的序列相似度

Tab. 2 Sequence similarities to closest relatives and phylogenetic affiliations of DNA recovered from DGGE gel

序号	登录号	比对近缘种(登陆号)	相似度(%)
W1	HQ014566	*Saprolegnia litoralis*(AF235952)	87
W2	HQ014567	*Corticium roseum*(AY463401)	92
W3	HQ014568	*Marchandiomyces buckii*(DQ915472)	96
W5	HQ014569	*Tomentella botryoides*(AY586717)	91
W6	HQ014570	Uncultured Malassezia(EU046072)	98
W7	HQ014571	*Alternaria tenuissima*(FJ755240)	100
W8	HQ014572	*Glonium pusillum*(EU552134)	99
W9	HQ014573	*Saccardoella rhizophorae*(GU479799)	90
W11	HQ014574	*Diplomitoporus crustulinus*(AY333816)	91
W16	HQ014575	*Botryotinia fuckeliana*(AY544651)	97
W17	HQ014576	*Saccardoella rhizophorae*(GU479799)	88
W18	HQ014577	*Botryosphaeria melanops*(DQ377856)	88
W19	HQ014578	*Cladosporium langeronii*(DQ780380)	98
S1	HQ014579	Uncultured zygomycete(EU490019)	86
S2	HQ014580	*Botryotinia fuckeliana*(AY544651)	98
S3	HQ014581	*Rhizophlyctis rosea*(EU379191)	77
S4	HQ014582	Uncultured zygomycete(EU490019)	82
S5	HQ014583	*Corticium roseum*(AY463401)	92
S8	HQ014584	*Tomentella botryoides*(AY586717)	91
S9	HQ014585	*Glonium pusillum*(EU552134)	98
S10	HQ014586	*Alternaria tenuissima*(FJ755240)	100
S11	HQ014587	*Didymella fucicola*(EF177850)	100
S13	HQ014588	*Dactylaria parvispora*(EU107296)	85
S18	HQ014589	*Catenulostroma protearum*(GU214401)	93
S19	HQ014590	*Cladosporium langeronii*(DQ780380)	100
S20	HQ014591	*Cladosporium* sp.(GU017546)	99

2009 年 5 月份太湖各湖区处于不同的营养水平,其中营养指数相对较高的西部沿岸区、南部沿岸区、梅梁湾、竺山湖,均已处于中度富营养化,而东太湖的营养指数在 8 个湖区中最低[26]. 在营养水平高的太湖西部沿岸区、梅梁湾的水生真菌多样性要明显低于营养水平低的东太湖. CCA 分析发现水体中 TN、TP 的浓度对于水生真菌群落组成具有较大的关联作用. Luo 等[27]通过研究抚仙湖和滇池湖水中基质上的水生真菌,发现营养水平较低的抚仙湖真菌多样性高于营养水平较高的滇池. 水生真菌多样性对于水体富营养化的此种响应在一些淡水湖泊中的微型浮游生物、大型浮游动物多样性方面均有所表现[28].

本研究发现,西部沿岸区、梅梁湾等处少有水草分布,而东太湖采样点水生植被覆盖率较高,有较大面积的马来眼子菜、苲菜、野菱、茭草等水生植被优势种分布,为水生真菌生长提供了适合的附着基质. 这也可能是东太湖比梅梁湾等西半湖区域真菌数量和种类丰富的原因. Rankovic 等[29]研究也发现在水草生长旺盛区域的真菌种类比没有水草生长区域的真菌种类多.

DGGE 图谱分析显示了沿岸湖区比湖心区的真菌多样性有明显增高的趋势. 相比风浪较多、水位变幅较大的湖心区,沿岸湖区提供了更适宜真菌生长的安静环境. 水生真菌大部分腐生在水里的枯木、叶子、泡沫等附着物上,受湖流的影响,广阔湖区分布的附着物会被不断地输送并富集到湖岸区域,这为真菌生长繁殖提供了有利条件. 湖心区因风浪较多,沉积物悬浮、透明度降低成为该区的重要特征[30],高强度的扰动可能影响了水生真菌的生长. 也有研究表明太湖湖心区沉积物悬浮的强烈扰动影响了该区细菌群落分布[31]和微生物食物网结构[32].

由 DGGE 图谱分析还可以发现水体和沉积物中的真菌多样性存在差异,这主要与水生真菌对于栖息环境的选择有关. 真菌等微生物是极易受到环境影响的生物类群,能对水体和沉积物生态机制变化作出反

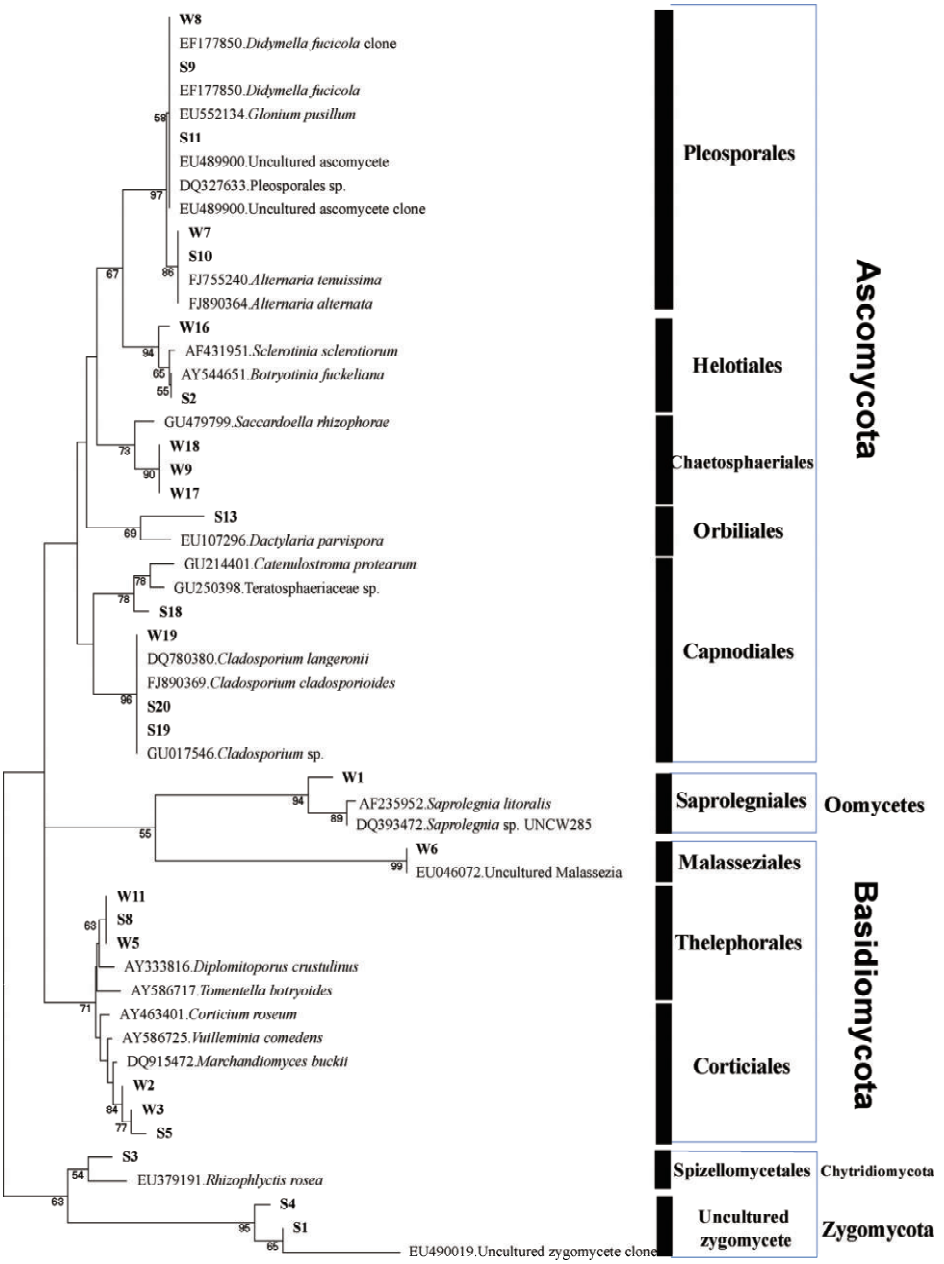


图 9 代表性条带(图 3 和图 7 部分标记条带)的 28S rDNA 序列(240 - 280bp)构建的系统进化树

Fig. 9 Phylogenetic affiliation tree of the 28S rDNA partial sequences(240 - 280bp) from the specific band (partial marked bands in Fig. 3 and Fig. 7)

应[33]. 多数水生真菌进行分解代谢时需要消耗水中的溶解氧. 有研究表明当溶解氧浓度降低时,会强烈影响到水生真菌的群落结构和分解功能[34]. 而表层沉积物附近常为缺氧还原状态,仅存在一些厌氧型真菌,因此,沉积物中水生真菌多样性低于水体中的是可以解释的.

3.3 太湖水生真菌群落结构和主要类群组成

由 DGGE 图谱可以看出，不同湖区的样品带型存在共同条带和各自的特征条带，W3、W5、W8 这三条带为全湖范围内的优势条带，其对应近缘种分别为 *Marchandiomyces buckii*（Basidiomycota）、*Tomentella botryoides*（Basidiomycota）和 *Glonium pusillum*（Ascomycota），这表明担子菌和子囊菌为太湖不同湖区水生真菌的优势类群，且子囊菌（57.7%）比担子菌（26.9%）在太湖中分布更广泛，这一结果与陆地森林生态系统相反[35]，而与冻原生态系统相似[36]. 对于条带 W17、W18、W19，其条带强度信号存在区域性变化，它们的比对近缘种均属于子囊菌，这说明子囊菌可能对于水体营养水平的变化具有很好的指示作用. 淡水真菌种类繁多、分布广泛，主要包括：子囊菌、担子菌、接合菌、壶菌、卵菌等多个门类，目前淡水真菌的多样性研究多集中在高等淡水真菌，主要是子囊菌，而其他低等淡水真菌的研究仍然很少[37]. 子囊菌主要分解纤维素、木质素[38]，其生长可能依赖于如可溶性碳水化合物这样的较易利用能源，而担子菌主要通过产生木质素修饰酶，以降解木质素为生[39]. Cai 等在对淡水子囊菌的综述中统计了 511 种淡水子囊菌，并提供 169 属检索表[40]. 淡水子囊菌分布广泛可能与其形态上有适应于淡水生境的特点有关. 多数子囊孢子有各种各样的外鞘、附属物或孢子壁上有特殊的修饰，这些结构有利于孢子分散，使孢子更易于附着在基质上[41].

研究还发现在水体和沉积物中的水生真菌有明显垂直分布差异的优势类群. 条带 W1 近缘种为卵菌纲水霉目一种，仅在东太湖（D9）水体中检测到，这类真菌的营养体大多为发达的菌丝体，无性繁殖产生游动孢子囊，具有两游现象，且多数在水中腐生，少数寄生于藻类上. 在泳道 D9 中还存在一些独特的条带，这些可能都与东太湖低营养水平、多水生植物分布等因素相关. 条带 S1、S3、S4 仅分布于沉积物中，其对应近缘种分别为 Uncultured zygomycete（Zygomycota）、*Rhizophlyctis rosea*（Chytridiomycota）、Uncultured zygomycete（Zygomycota），这些类群主要归属于接合菌门和壶菌门. 壶菌门菌物常腐生在沉积物表面动、植物残体上，接合菌门菌物多为腐生，有些可与高等植物共生形成菌根，它们在表层沉积物中被检测到也是可以解释的.

致谢：本实验在野外样品采集和水质理化分析过程中得到南京大学生命科学学院的大力支持与帮助，并提供了部分水质数据，特此致谢.

4 参考文献

[1] Baretta-Bekker JG, Baretta JW, Hansen AS *et al*. An improved model of carbon and nutrient dynamics in the microbial food web in marine enclosures. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, **14**:91-108.

[2] Lindstrom ES. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbiology*, 2000, **40**:104-113.

[3] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1):143-169.

[4] Caron DA, Gast RJ, Lim EL *et al*. Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions. *Hydrobiologia*, 1999, **401**:215-227.

[5] 金 静，李宝笃. 海洋真菌的研究概况. 菌物学报，2005，**24**(4)：620-626.

[6] Richards TA, Vepritskiy AA, Gouliamova DE *et al*. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(9): 1413-1425.

[7] Chen MJ, Chen FZ, Zhao BY *et al*. Spatio-temporal variability of microbial eukaryotic community composition in a large shallow subtropical lake, assessed by 18S rRNA gene sequences. *Acta Protozool*, 2009, **48**:245-264.

[8] López GP, Rodriguez VF, Pedros AC *et al*. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 2001, **409**:603-607.

[9] Wu X, Xi WY, Ye WJ *et al*. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, **61**:85-96.

[10] 冯 胜，秦伯强，高 光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应. 环境科学学报，2007，**27**(11)：1823-1829.

[11] Chen MJ, Chen FZ, Yu Y *et al*. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. *Microbial Ecology*, 2008, **56**:572-583.

[12] Chen MJ, Chen FZ, Xing P *et al*. Microbial eukaryotic community in response to *Microcystis* spp. bloom, as assessed by

an enclosure experiment in Lake Taihu, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010,**74**:19-31.

[13] 戴 欣,王保军,黄 燕. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. 微生物学报,2005,**45**(2):161-165.

[14] 饶志明,赵有玺,李 辉. 太湖流域土壤微生物基因组总 DNA 分离纯化及其质粒文库的初步构建. 应用与环境生物学报,2004, **10**(6):774-777.

[15] Wong MKM, Goh TK, Hodgkiss IJ *et al*. Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 1998,**7**:1187-1206.

[16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版). 北京:中国环境科学出版社,2002.

[17] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996,**62**:316-322.

[18] 吴敏娜,张惠文. 提取北方土壤真菌 DNA 的一种方法. 生态学杂志,2007,**26**(4):611-616.

[19] Sandhuet GS, Kline BC, Stockman L *et al*. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Cinical Microbiology*, 1995, **33**(11):2913-2919.

[20] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA *et al*. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003,**43**:1-11.

[21] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985,**39**:783-791.

[22] Friedrich V, Wintzingerode UB, Gobel ES. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997,**21**:213-229.

[23] Mette HN, Neils BR. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, **50**:189-203.

[24] Bridge P, Spooner B. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil*, 2001, **232**:147-154.

[25] 姜 敏. 浙江淡水真菌分类研究[学位论文]. 泰安:山东农业大学,2008.

[26] 太湖流域水资源保护局. 太湖流域及东南诸河省界水体水资源质量状况通报. 2009,**144**.

[27] Luo J, Yin JF, Lei C *et al*. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Diversity*, 2004,**16**:93-112.

[28] 谢 平,诸葛燕,戴 莽等. 水体富营养化对浮游生物群落多样性的影响. 水生生物学报, 1996,**20**(增刊):30-37.

[29] Rankovic R. Five Serbian reservoirs contain different fungal propagules. *Mycologia*, 2005,**97**(1):50-56.

[30] Chen W, Chen Y, Gao X *et al*. Eutrophication of Taihu and its control. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 1997,**6**:106-120.

[31] Xing P, Kong F. Intra-habitat heterogeneity of environmental factors regulating bacterio-plankton community composition in Lake Taihu, China. *Aquatic Microbial Ecology*, 2007,**46**:113-122.

[32] Wu QL, Chen Y, Xu K *et al*. Intrahabitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China. *Hydrobiologia*, 2007,**581**:241-254.

[33] Yoza BA, Harada RM, Nihous GC *et al*. Impact of mariculture on microbial diversity in sediments near open ocean farming of *Polydactylus sexfilis*. *Ecological Indicators*, 2007,**7**(1):108-122.

[34] Medeiros AO, Pascoal C, Graça MAS. Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. *Freshwater Biology*, 2009,**54**:142-149.

[35] O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005,**71**:5544-5550.

[36] Schadt CW, Martin AP, Lipson DA *et al*. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils. *Science*, 2003,**301**:1359.

[37] Goh TK, Hyde KD. Biodiversity of freshwater fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996,**17**:328-345.

[38] Osonko T, Takeda H. Comparison of litter decomposition ability among diverse fungi in cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia*, 2002,**94**:421-427.

[39] Osonko T, Fukasawa Y, Takeda H. Roles of diverse fungi in Larch needle-litter decomposition. *Mycologia*, 2003,**95**:820-826.

[40] Cai L, Shearer CA, Zhang KQ *et al*. Freshwater Ascomycetes. *Fungal Diversity Research Series*, 2003,**11**:273-323.

[41] Digby S, Goos RD. Morphology development and taxonomy of Lorumyces. *Mycologia*, 1987,**79**:821-831.