

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20160729002

张宛宛, 谢玉为, 杨江华, 等. DNA 宏条形码(metabarcoding)技术在浮游植物群落监测研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 15-24

Zhang W W, Xie Y W, Yang J H, et al. Applications and prospects of metabarcoding in environmental monitoring of phytoplankton community [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 15-24 (in Chinese)

DNA 宏条形码 (metabarcoding) 技术在浮游植物群落监测研究中的应用

张宛宛¹, 谢玉为¹, 杨江华¹, 杨雅楠¹, 李娣², 张咏², 于红霞¹, 张效伟^{1,*}

1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210023

2. 江苏省环境监测中心, 南京 210000

收稿日期: 2016-07-29 录用日期: 2016-10-31

摘要: 保护生物多样性和生态系统健康是维持生态系统功能和实现人类可持续发展的必要条件。浮游植物作为水生生态系统的初级生产者发挥着重要的生态功能, 同时有毒藻类的爆发也会威胁水生态安全。然而, 基于形态学的物种鉴定方法难以满足日益增长的水生态环境监测的需求。DNA 条形码技术利用基因组特定基因的 DNA 序列来鉴别生物物种, 目前已被广泛用于快速物种鉴别。然而其在水生生态系统浮游植物群落的监测中才刚刚起步。由于浮游植物物种多样性高, 单基因 DNA 条形码往往难以识别所有浮游植物种类; 近年来, 采用多基因条形码、全叶绿体基因组序列的超级条形码, 以及特定 DNA 条形码方法在浮游植物种类鉴别中有很大潜力。本文综述了浮游植物 DNA 条形码技术在物种鉴别研究方面的进展, 以及 DNA 宏条形码技术(DNA metabarcoding)在水生浮游植物环境监测的应用现状及前景。

关键词: 浮游植物; DNA 条形码; 生态系统健康; 物种多样性

文章编号: 1673-5897(2017)1-015-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Applications and Prospects of Metabarcoding in Environmental Monitoring of Phytoplankton Community

Zhang Wanwan¹, Xie Yuwei¹, Yang Jianghua¹, Yang Yanan¹, Li Di², Zhang Yong², Yu Hongxia¹, Zhang Xiaowei^{1,*}

1. State Key Laboratory of Pollution Control & Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Provincial Environment Monitoring Center, Nanjing 210000, China

Received 29 July 2016 accepted 31 October 2016

Abstract: The protection of biodiversity and ecosystem health is essential for the function of ecosystem and the sustainable development of human beings. Phytoplankton is the primary producer of aquatic ecosystem, and its biodiversity is one of the important indicators of environmental biological monitoring. However, the growing demand for environment monitoring of phytoplankton is limited by the morphology-based method. DNA barcoding which uses short DNA sequences of specific gene in genome, has been widely used for rapid species identification.

基金项目: 江苏省太湖水环境综合治理科研课题(TH2014207); 江苏省环境监测基金(1621); 国家重大“水专项”课题(2012ZX07506-003, 2012ZX07101-007)

作者简介: 张宛宛(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学, E-mail: zachary123@126.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

However, the application of DNA barcoding in the monitoring of phytoplankton communities in aquatic ecosystems has just started. Due to the high diversity of phytoplankton species, based on single gene DNA barcoding is insufficient to identify all phytoplankton species. Recently, the use of multiple barcodes, superbarcode of complete chloroplast genome sequence, as well as the specific barcode has demonstrated potential to distinguish phytoplankton species in either single species or environmental sample. This review summarized the recent advancement in research of DNA barcode technology in the species identification of phytoplankton, and the current status and prospects of DNA metabarcoding in environmental monitoring of aquatic phytoplankton.

Keywords: phytoplankton; DNA barcoding; ecosystem health; biodiversity

1 现状

浮游植物生物监测是水生生态系统完整性监测的重要组成部分之一^[1],监测浮游植物群落的物种组成和结构可以为评价水生态系统的环境质量和健康提供依据^[2],进而为环境保护和生态治理的科学决策提供依据。

首先,浮游植物作为水生生态系统中重要的生态类群,构成了地球上一半以上的初级生产力,是水生生态系统能量传递和物质流动的基础^[3-4]。其次,浮游植物具有个体小、细胞结构简单、生长周期短等特点,对环境的变化极为敏感。浮游植物的种群结构和生物量能及时地反映水域生态环境的变化^[5]。再次,在全球性的水体富营养环境下,有毒藻类的大量增殖可对水生生态系统的健康产生损害。湖泊和海湾等缓流水体中的浮游植物及其他浮游生物迅速繁殖,致使水体溶解氧量下降,水质恶化,鱼类及其他生物大量死亡。微囊藻属、鱼腥藻属和颤藻属等蓝藻的爆发将导致蓝藻水华;小环藻属导致硅藻水华,以及衣藻、水绵属和转板属等将导致绿藻水华^[6]。蓝藻、甲藻、针胞藻、定鞭金藻、金藻类和硅鞭藻的许多藻种都是有毒藻类^[7],这些藻类的次级代谢产物“藻毒素”不仅会引起水生生物的死亡,导致水生生态系统失衡,同时也通过生物富集和生物放大作用,经食物途径威胁人类的健康^[8-11]。

伴随着工业化和城市化,我国大部分水体正遭受着不同程度的人为干扰和破坏。鉴于浮游植物重要的生态功能,其对水环境质量的指示作用,以及有害藻水华的潜在危险,开发准确、快速、大规模、标准化的水域浮游植物生物监测技术能够为水域生态环境健康和人类用水安全提供支撑。

然而浮游植物多样性高,基于形态学的鉴定方法难以满足水生态环境监测的需求。浮游植物监测的重点是调查浮游植物的种类组成和数量分布,其最重要的监测指标是“优势藻种判定”及“藻密度计

算”。国际公认的浮游植物生物监测的经典方法是显微鉴定计数法。传统基于形态学的藻类物种鉴定需要专业系统分类学人才,且工作量大,耗时长,准确性易受人为主观因素干扰,难于进行标准化、质量控制和多实验室多中心比对。此外,浮游植物个体大小差异大,其中超微型浮游植物(0.8~5 μm)体积微小且许多种类缺乏明显的形态学特点,利用传统的观察法难以鉴别区分^[12]。包括计算机辅助形态学自动分析技术^[13]、荧光光谱技术^[14-15]、流式细胞术^[16-18]、遥感监测^[19]等基于形态或光谱特征的新兴自动化分类鉴定技术,能对浮游植物进行初步的鉴别。然而,由于部分浮游植物的种间形态学差异不明显,种类不同生命周期形态变化大,且色素种类有限,上述新兴自动化分类鉴定技术仍然无法对浮游植物群落进行准确、精细的解析,尤其是亲缘关系较近的物种不能实现准确鉴别,而且上述技术也无法实现有毒藻的快速鉴别。

最新发展的分子生物学技术—DNA 宏条形码技术为浮游植物物种、种群和群落的分子生态鉴定和生物监测提供了新的机遇,正成为研究热点^[20]。分子生态学技术可以通过设计特异性探针进行杂交来鉴别浮游植物的种类;也可采用限制性片段长度多态性分析(RFLP)等技术分析群落结构组成^[21]。随着 DNA 条形码(DNA barcoding)的提出与发展,尤其是浮游植物物种 DNA 条形码数据的构建与开放,基于 DNA 条形码技术的浮游植物物种鉴别方法展现出准确、快速、高效和可标准化的优势,有极大的应用前景。为此,本文通过文献调研,对浮游植物的 DNA 条形码的发展历程、分析方法和应用进行综述,并在此基础上对我国基于 DNA 条形码技术的浮游植物分子生态学研究进行展望。

2 DNA 条形码技术在浮游植物物种鉴定中的应用现状及前景

DNA 的物种鉴定方法的发明与发展物种间

DNA 序列的差异为物种鉴定提供了新的解决方案^[22]。最初,许多不同的核基因和细胞器基因的 DNA 片段被 PCR 扩增和测序用于物种鉴定。这些技术被统一称为 DNA 条形码技术^[23]。

DNA 条形码是选用细胞核或细胞器基因组特定基因上、短的 DNA 序列,进行针对性的扩增和测序来鉴别生物物种的技术。由于不同物种在同一 DNA 条形码区域存在差异,通过 DNA 条形码与参考数据库比对可实现物种的鉴别^[24]。DNA 条形码技术不仅能够避免传统分类学的人为误差,而且省时省力。随着测序技术的发展,DNA 条形码技术迅速发展,数据库不断完善,使得 DNA 条形码技术的准确性更高。

2.1 单基因条形码

浮游植物单基因条形码可来源于叶绿体、线粒体和核基因组(图 1、表 1)。如图 1 所示为浮游植物 DNA 条形码的主要区域、发展的历程以及未来的发展方向。目前研究中常见的单基因条形码区域见表 1,现在广泛使用的为核基因、线粒体基因以及叶绿体基因。

因为叶绿体基因的进化速率比核基因低,所以目前关于 DNA 条形码技术的研究多依赖于叶绿体基因^[44]。除了表 1 中描述的单基因条形码区域外,还有许多其他广泛使用的叶绿体基因组条形码标识区域,如 *rpoB*, *tufA*, *trnH-psbA* 和 *trnL*^[45]。叶绿体基因组可以替代的区域表明复杂的突变过程并不是对称的,在序列间缺乏独立性^[46],叶绿体基因更适用于系统发育分析和更高分类水平的条形码相关研究,但是因为叶绿体基因组的进化率低,并不适用于较低分类级别的研究。叶绿体序列进化在物种间不一致,不同的叶绿体基因基因之间的系统发育也是不一致的^[47-48]。

目前因为单一基因 DNA 条形码区域在不同类群间缺乏较好的分辨率,所以尚未找到适用于不同分类级别的通用引物^[49]。

2.2 多基因条形码

许多研究表明,多基因的方法更适用于植物的物种鉴别^[50]。叶绿体基因组区域基因的多种组合包括 *rbcL* + *trnH-psbA*, *rpoC1* + *rpoB* + *matK* 或 *rpoC1* + *matK* + *trnH-psbA*(如图 1 所示)^[51],比单基因条形码的分辨率更高。Fazekas 等^[52]用相同的大型分类样本比较了这些组合,结果表明,上述多基因条形码区域仅能识别约为 70% 的实验类群。不同的研究组

织利用不同的基因区域条形码的组合对不同种群分辨率进行比较,试图从中找出通用引物,然而通用性尚未实现。

CBOL(Consortium for the Barcode of Life-Plant Working Group)推荐 *matK* + *rbcL* 作为通用引物组合,因为这一组合比其他组合的识别率高。但是 *matK* + *rbcL* 组合不能避免 *matK* 引物 PCR 效率低的问题。其次 *matK* + *rbcL* 组合成功鉴别的成功率比 *COI* 低,仍然满足不了作为通用引物的目标。首先,相比于单基因条形码标识,条形码组合使得分析更加困难,特别是在其中一个基因不能实现普遍扩增的情况下。更重要的是,CBOL 表明几种候选基因的使用相比于 *rbcL* + *matK* 不能显著增加物种的鉴别能力。一些学者认为^[53, 54],多基因条形码不能增加物种鉴别能力不能归因于变异太少,而是反映了叶绿体基因和物种界限之间的差异。因此,候选基因条形码基因不能解决植物目前 DNA 条形码的不足的问题。

2.3 超级条形码

为克服单基因条形码固有的局限性,最近报道指出完整的叶绿体基因组包括尽可能多的突变基因,能够用作植物条形码^[55]。完整的叶绿体基因组的保守序列长度为 110~160 Kbp,大大超过了通常使用的 DNA 条形码的长度,能够提供更多变异性来区分近亲植物。叶绿体基因组能够大大增加植物系统发育较低分类水平的分辨率,系统地理学和种群遗传

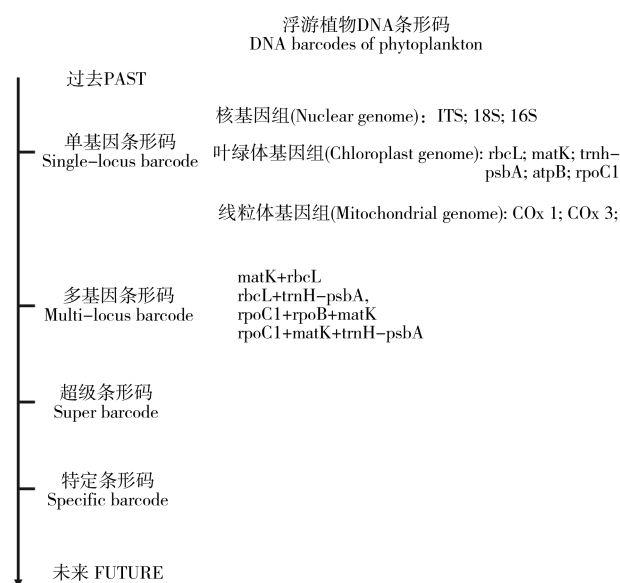


图 1 浮游植物 DNA 条形码发展历程

Fig. 1 Historical development of DNA barcode in phytoplankton

表 1 单基因 DNA 条形码简述
Table 1 Description of single locus DNA barcode

条形码 Barcode	基因 Gene	基因组 Genome	适用类群 Applicable groups	优缺点 Advantages and disadvantages	引物 Primers	参考文献 References
COI	细胞色素 C	线粒体 基因组 Mitochondrial genome	大部分红藻门;褐藻门; 硅藻门;甲藻门;蓝藻门 Most of Rhodophyta, Phaeophyta, Bacillariophyta and Dinophyta; Caulerpales	优点:进化速率比核基因组快,序列短,种间差异明显 Advantages: higher evolutionary rate than nuclear genome, shorter length, obvious interspecific divergence 缺点:只适用于较低等浮游植物,通常单个 COI 基因不 能完全实现区分,需要其他基因辅助鉴别 Disadvantages: suitable for lower phytoplankton, may re- quire other genes	GazF1: TCAACAAATCATATAAGATATTGG GazR1: ACTTCTGGATGTCCAAAAAAYCA GazF2: CCAACCAAYAAAGATATWGGTAC DumR1: AAAAAAYCARAATAAATGTTGA	[35-37]
	氧化酶亚基 I					
	Mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I					
ITS	nrDNA 基因间隔区	核基因组 Nuclear genome	硅藻门;甲藻门; 红藻门江藻属 Bacillariophyta; Dinophyceae, <i>Gracilaria</i> (Rhodophyta)	优点:分辨率高,片段短,易于扩增和测序 Advantages: high discrimination, shorter length, easy to am- plify and sequence 缺点:扩增成功率不高,长度变异大 Disadvantages: amplification success rate is not high, large difference in length at different group	SR1: TACCTGGTTGATCCTGCCAG SR5: ACTACGAGCTTTTAACTGC	[38-43]
	Internal transcribed spacer					
RbcL	1,5-二羧酸核酮糖羧 化酶/加氧酶大亚基	叶绿体 基因组 Chloroplast genome	隐藻纲;眼点藻纲;定鞭藻纲; 针胞藻纲;甲藻纲;中心硅藻纲; 红皮藻科,石莼纲 Cryptophyceae, Haptophyceae, Raphidophyceae, Dinophyceae, Centricae, Rhodymeniaceae, Chlorophyta, Ulvophyceae	优点:易扩增,科属水平鉴别能力高 Advantages: easy to amplify, discrimination with high ability at family and genus levels 缺点:进化缓慢,种水平区分能力一般, 全序列测序需要四对引物 Disadvantages: evolve slowly, modest discriminatory power at species level, entire gene sequence may require four primers	f: GATGATGARAAYATTAACTC r: ATTTGDDCCACAGTGDATAACCA Idf: GATGATGARAAYATTAACTC Idr: ATTTGDDCCACAGTGDATAACCA labf: TCIGCIAARAACACTAYGGTCG labr: GGCAITRTGCCAIACTRTGRAT	[25-29]
	Ribulose-1,5- bisphosphate					
	carboxylase/oxygenase					
matK	叶绿体成熟酶 K maturase K	叶绿体基因组 Chloroplast genome	轮藻科(绿藻门) Characeae (Chlorophyta)	优点:进化速率快,长度适中,种间差异明显,转化速率低; Advantages: high evolutionary rate, suitable length, obvious interspecific divergence, low conversion rate 缺点:现有引物很难实现普遍扩增,不同类群所选用的 引物对也不尽相同 Disadvantages: cannot generally be amplified using a single primer pair, different primer pairs were required in different taxonomic groups	2B: GGGTTGCTAACTCAATGG 12B: AACTCGTCGGATGAAGTA	[30-34]

分析,促进种群谱系的恢复,因此能够作为在物种水平鉴别的DNA条形码^[56]。使用叶绿体基因组作为标识物能够规避基因缺失和PCR效率低等问题^[57]。与核基因组相比,叶绿体基因组长度小,种间差异大,种内差异小,这就使得叶绿体基因组更适用于作为基础条形码。也可以根据任2个物种间存在的基因进行物种鉴定,这被认为是基于DNA条形码的最简便的物种鉴定方法。而且超级条形码在检测基因缺失和测序方面比传统的条形码更有效^[58-59]。

超级条形码的发展主要面临的挑战是构建丰富的叶绿体基因组库、降低测序成本、以及获得更高质量和数量的DNA^[60]。第一个叶绿体基因组在1986年测序完成,到2012年有254个完整的植物叶绿体基因组公共数据库完成,仅占完整植物物种的0.01%,仍然只是物种鉴别中的一小部分。随着新一代测序技术(NGS)的发展,叶绿体基因组在2012年发表的数量远远超过了过去20年间测序的数目,叶绿体超级条形码也可以进行针对植物特定种群的关系研究^[61-62]。

最近的研究表明可以使用整个DNA作为叶绿体基因组测序的模板,这不仅仅解决从干物质甚至是已经降解了的材料中提取叶绿体DNA的问题,并且简化了整个过程^[63]。随着测序成本大幅下降和生物信息学的发展,基于全叶绿体基因组的超级条形码将成为浮游植物物种鉴别的一个重要方向。

2.4 特定条形码

相对于单基因条形码缺乏足够的突变,而超级条形码的注解目前又比较昂贵,特定条形码的提出为浮游植物物种分子鉴定提供了新的思路。特定条形码是一段具有高突变率,在给定的物种类群中能够进行准确鉴别的DNA序列。由于特定条形码是直接从目标科、属的质粒基因组序列中选定,通用引物很容易设计。这就避免了PCR效率低的问题,能够尽可能的利用时间和资源^[64]。其次,给定属的物种具有相同的基因和基因序列,简化了在多个目标类群序列的采集过程。另外,特定条形码容易控制到合适的长度,这就避免了序列长度可变引起的序列模糊比对的风险。

从样品中获得特定条形码的方法比获得超级条形码简单,并且对于条形码区域的选择也比较多变,可以是基因,基因间隔区,部分基因序列,部分基因间隔区,甚至是包含部分基因序列和部分基因间隔区的序列。虽然浮游植物种类繁多,对所有浮游植

物进行鉴别需要的条形码的数量庞大。但是,特定DNA条形码在更高的分类水平上可以使用相同的条形码,这就使得该方法更具吸引力。

目前,对特定物种鉴别选择特定条形码时,要关注以下几个方面:首先,评估CBOL提供的候选条形码^[65-66];其次,选择给定种群中常用的标识物;再次,搜寻突变热点,通过调查单个具有代表性的质粒基因组的寡核苷酸重复序列的分布和重复、缺失和替换的关系来找到基因位点^[67];最后,或者通过叶绿体标识分析来选择能够充分显示物种水平上的差异的合适基因^[68]。特定条形码更倾向于使用后面的方法来找到完整物种水平鉴别的条形码。具体的条形码可以是单基因条形码的一种或者是那些从未使用过的新型标识物。

DNA条形码的最初目标是找到通用条形码。然而,在叶绿体中谱系特异性进化和基因的非随机替换存在的情况下,这一目标难以实现。除了基因和基因间隔区,其他大差异DNA片段也可用作标识物。虽然叶绿体基因组序列能够解决某些特定类群中难以显微鉴别的边界物种问题^[69],但是叶绿体基因组序列只给分类学家提供物种鉴别的边界上的一些建议是不够的,所以改善叶绿体基因组分析方法的可利用性能够提供一些工具来解决物种的边界问题。

特定条形码的应用应该满足2个先决条件:(1)叶绿体基因组序列被注释的数据库(但是这些并不需要所有的目标类群基因组完全注释);(2)有丰富的关于各个类群的叶绿体基因组引物的数据库。已知的物种能够从引物库中通过使用相应的特定条形码进行区分。对于未知物种的鉴别需要2步:首先,在科或者属水平上用单基因条形码进行鉴定;其次,从叶绿体基因组数据库中选定符合条件的特定条形码在种水平上进行鉴别。虽然两者的方法都依赖于2个条形码基因,但是特定条形码在第二阶段通过比对叶绿体基因组,而以前的分类方法依赖于通常使用的标识物。特定条形码的选择比较灵活,在特定种群上的鉴别水平很高,可以确定到属或者种。获得足够的叶绿体基因组,从DNA片段中确定一个合适的特异条形码是关键一步。

3 DNA 宏条形码技术在浮游植物群落结构监测中的应用现状及前景

在环境监测中,往往需要对水体中浮游植物的群落物种组成和多样性进行分析,DNA技术的发展

为这一需求提供了新的手段。在1998年,Handlesman等^[70]首次提出了宏基因组学(metagenomics)的概念,随着高通量测序技术和DNA条形码技术的发展,关于宏基因组学的研究也更加广泛。从单个环境样品中(土壤、水样、粪便),甚至是古代环境样本中获取DNA,然后进行分子标记的PCR扩增,进行高通量测序的技术称为DNA宏条形码(metabarcoding)技术^[71-72]。而DNA宏条形码于2011年首次提出时就被指出其在分析生物多样性上的应用价值。

宏条形码技术是结合DNA条形码和高通量测序的方法用于生物多样性快速评估的新技术。如前所述,DNA条形码技术选定用于鉴别的基因应该具有两大特征:首先,选定条形码区域种间差异明显,种内差异小;其次,序列易于PCR扩增,并且便于设计通用引物。高通量测序技术能够完成不同基因、不同样本、不同物种的DNA序列的测序,新一代测序技术的发展为生物多样性的评估提供了强大的技术支撑^[73]。图2所示为宏条形码技术路线图。

通过宏条形码(metabarcoding)技术可以进行如下工作:

(1)对环境样本的浮游植物进行物种多样性分析,鉴别浮游植物的种类,以及群落的结构,通过比

较浮游植物的生物多样性差异与水生生态系统的健康状态建立联系^[74];Zimmermann等^[75]对奥德拉河和尼萨河硅藻进行研究,分别用传统形态学和硅藻18SrRNA V4区域的宏条形码鉴别方式对每个采样点的硅藻物种多样性和丰度进行了比较。结果表明,硅藻物种多样性和丰度能体现不同区域的营养状态,在水质评估方面具有很大潜力,并且DNA条形码技术在物种鉴别上优于显微镜鉴别。(2)大范围的水生生态系统的物种多样性监测;Zaiko等^[76]进行了一项长途旅行实验,他们从Bremerhaven出发,到达Cape Town,跨越纬度范围约为90°,对船舱中不同时间的水样进行监测采样,利用宏条形码技术分析不同时间船舱中的物种数目,分析物种入侵的可能性,实验说明宏条形码技术在物种入侵环境监测发挥很大作用,是环境监管和物种入侵问题重要的分子生物学手段。Corse等^[77]选择34种生态学分支特异性引物(包括动物、藻类、植物等)对21个欧洲常见鱼类粪便进行分析,试图建立欧洲河流生态系统之间的食物网捕食关系。宏条形码可以用于水生生态系统的物种多样性、生物量、群落结构的监测,构建污染物与群落结构之间的关系,预测评估生态系统的健康程度,甚至可以用于古生物物种、古生态系统的群落结构鉴别。(3)新物种和入侵物种的发现;Saunders等^[78]通过COI基因条形码对加拿大海区的白蒙藻科和江蓠目藻种的研究中发现本来不存在于该海区的物种,经过进一步的分析确定为入侵物种,这说明可以运用DNA条形码技术来发现新物种,并对物种的亲缘关系进行确定。Wang等^[79]利用ITS区域将存在3个形态种—塔玛亚历山大藻复合种重新划分成遗传差异显著的5个新种,用DNA条形码的差异比对划分物种,比传统的分类更具准确性和遗传意义。(4)通过对浮游植物的DNA条形码序列的分析建立系统发育关系,分析浮游植物的进化发展史^[80];Destombe等^[81]通过利用3种不同区域的条形码cox2-cox3间隔区、rbcL和ITS2区域,对红藻门江蓠属2个种在欧洲北大西洋和摩洛哥海岸的形态上的差异来解释它们形态上的差异原因,并描述这2个物种的近200年间的系统发育关系。

目前宏条形码技术在环境生物监测中主要面临3个挑战:(1)由于DNA无法判断生物的活性,宏条形码技术会受到来自死亡个体DNA的干扰。环境DNA(environmental DNA,eDNA)并没有进行不同物种DNA的分离,包含活细胞或者是有机体的DNA,

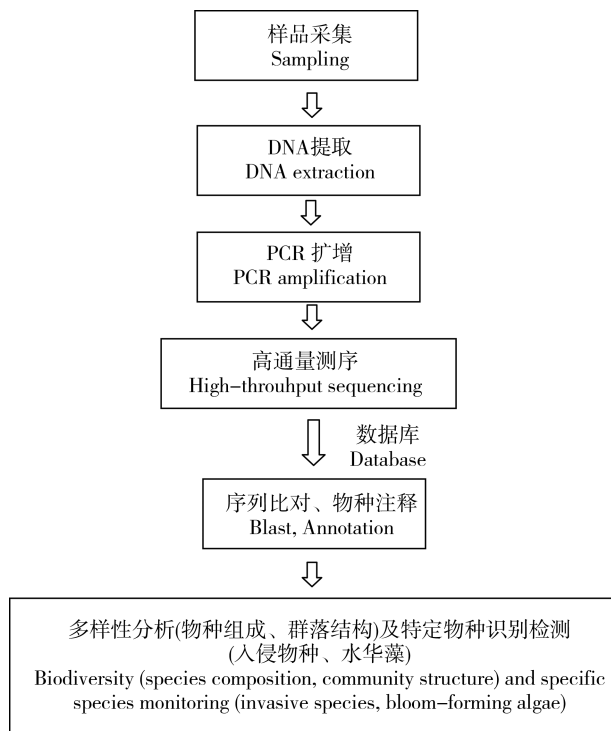


图2 宏条形码技术路线图

Fig. 2 Metabarcoding technology roadmap

甚至是细胞死亡后没被降解的那部分 DNA^[82]。由于 RNA 主要只能在活的细胞中提取,基于 RNA 和 RNA/DNA 相结合的宏条形码技术为浮游植物群落的环境监测提供了解决方案。(2)缺乏完善的本土浮游植物条形码数据库。尽管基于目前的生物信息学技术,条形码技术能够快速准确的实现群落中浮游植物基于分子遗传距离的物种划分和群落结构的分析。但是缺乏完善的本土浮游植物数据库,使得大量的宏条形码数据不能注释,从而不能得到有效的应用。当前世界各地在建的浮游植物条形码数据库的开源与共享无疑为宏条形码数据的物种注释提供了有力的资源。由于传统基于形态学的浮游植物物种分类系统在世界各地存在差异,国际 DNA 条形码数据库在环境监测中的可利用价值依然存在不确定性。因此本土物种条形码数据库的构建十分重要。(3)特异性条形码测序引物的研究。淡水浮游植物种类繁多,以太湖为例,浮游植物群落测序分析已经检测出逾 10 个门,几十个纲的物种。如何准确实现在种水平上的识别,尚需开展特异性条形码测序引物的研究。

4 结论与展望

浮游植物是评价水生生态系统健康状态的重要指标之一,其中浮游植物的物种多样性和群落结构的变化是浮游植物研究的热点,也是水生生态系统监测的重要指标。传统的分析技术已经不能够满足大尺度,高精度的生态监测,亟需替代方法。而 DNA 条形码技术的发展以及在各领域的应用,逐渐成为快速鉴别浮游植物种类和群落结构的重要方法之一。寻找浮游植物通用条形码是必然的,但是现有的研究表明,单基因 DNA 条形码通用性较低,然而随着 PCR 技术和 NGS 技术的发展,以及更多的研究表明,双基因和多基因 DNA 条形码的分辨率比单基因高。特定条形码的鉴别能力更高,可以在属、种水平上完成植物的鉴别。并且随着植物叶绿体基因组数据库日益完善,选择叶绿体基因组作为超级条形码具有可能性。所以未来关于浮游植物 DNA 条形码的研究可以聚焦于叶绿体基因组超级条形码和特定条形码的研究。浮游植物 DNA 条形码物种标识技术能够实现物种的快速鉴别,包括物种多样性和群落结构的鉴别,在水生生态系统监测和环境监管中的应用潜力很大。

我国关于浮游植物的研究大多侧重于海洋,关于淡水水生生态系统浮游植物的研究较少。我国本土

浮游植物群落结构 DNA 物种标识技术的应用依然存在问题:(1)宏条形码技术获得的很多浮游植物的序列无法注释;(2)尚缺乏本土浮游植物的 DNA 条形码数据库,尤其是淡水浮游植物;(3)浮游植物的分离培养比较困难,DNA 条形码技术构建数据库存在一定困难。所以,以后关于浮游植物 DNA 条形码技术的研究可以注重于改进新技术,显微分离-单细胞-高通量测序技术对高多样性的浮游植物群落的鉴定;此外,关于有毒藻、水华相关藻属的基因组序列的研究,为新型分子监测技术在水生生态系统中的应用提供坚实基础。

通讯作者简介:张效伟(1978-),男,动物学和环境毒理学博士,教授,博士生导师,主要从事生态毒理学和健康风险评估方面的研究。

参考文献 (References):

- [1] 王备新, 杨莲芳, 刘正文. 生物完整性指数与水生生态系统健康评价[J]. 生态学杂志, 2006, 25(6): 707-710
Wang B, Yang L, Liu Z. Index of biological integrity and its application in health assessment of aquatic ecosystem [J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(6): 707-710
- [2] 于宁, 马锡铭, 赵洪波, 等. 河流水生态系统健康评价研究进展[J]. 环境保护与循环经济, 2014, 34(1): 49-51
Yu N, Ma X M, Zhao H B, et al. Research progress of river ecosystem health assessment [J]. Environmental Protection and Circular Economy, 2014, 34(1): 49-51 (in Chinese)
- [3] Falkowski P G, Laws E A, Barber R T, et al. Phytoplankton and Their Role in Primary, New, and Export Production[M]// Ocean Biogeochemistry. Springer Berlin Heidelberg, 2003: 99-121
- [4] Arrigo K R. Erratum: Marine microorganisms and global nutrient cycles [J]. Nature, 2005, 437(7057): 349-355
- [5] 柴毅, 彭婷, 郭坤, 等. 2012 年夏季长湖浮游植物群落特征及其与环境因子的关系[J]. 植物生态学报, 2014, 38(8): 857-867
Chai Y, Peng T, Guo K, et al. Community characteristics of phytoplankton in Lake Changhu and relationships with environmental factors in the summer of 2012 [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2014, 38(8): 857-867 (in Chinese)
- [6] 周云龙, 于明. 水华的发生、危害和防治[J]. 生物学通报, 2004, 39(6): 11-14
Zhou Y L, Yu M. Review on the occurrence, harm, prevention and control of water blooms [J]. Bulletin of Biology, 2004, 39(6): 11-14 (in Chinese)
- [7] Landsberg J H. The effects of harmful algal blooms on a-

- quatic organisms [J]. Reviews in Fisheries Science, 2002, 10(2): 113-390
- [8] Kurobe T, Baxa D V, Mioni C E, et al. Identification of harmful cyanobacteria in the Sacramento-San Joaquin Delta and Clear Lake, California by DNA barcoding [J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 1-12
- [9] 梁佳, 曹明明. 微囊藻毒素的研究进展[J]. 地下水, 2010, 32(2): 133-135
- Liang J, Cao M M. Advances in the study of microcystin [J]. Ground Water, 2010, 32(2): 133-135 (in Chinese)
- [10] Carmichael W W, Azevedo S M, An J S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(7): 663-668
- [11] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2005, 203(3): 264-272
- [12] De Vargas C, Audic S, Henry N, et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean [J]. Science, 2015, 348 (6237): 1261605
- [13] 刘伟. 计算机辅助鉴定技术在海洋浮游植物分类鉴定中的应用[J]. 科技信息, 2008(29): 31-32 (in Chinese)
- Liu W. Application of computer assistant identification technic in marine phytoplankton identification [J]. Science & Technology Information, 2008(29): 31-32 (in Chinese)
- [14] 梁曼, 黄富荣, 何学佳, 等. 荧光光谱成像技术结合聚类分析及主成分分析的藻类鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(8): 2132-2136
- Liang M, Huang F R, He X J, et al. [Algae identification research based on fluorescence spectral imaging technology combined with cluster analysis and principal component analysis [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(8): 2132-2136 (in Chinese)
- [15] 殷高方, 张玉钧, 王志刚, 等. 基于荧光传感方法的藻类在线监测[J]. 科技导报, 2010, 28(23): 40-45 (in Chinese)
- Yin G F, Zhang Y J, Wang Z G, et al. Online monitoring technology for algae by fluorescent sensing method [J]. Science & Technology Review, 2010, 28(23): 40-45 (in Chinese)
- [16] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 淡水微型浮游植物的 FCM 研究[J]. 中国环境科学, 2002, 22(2): 101-104
- Guo P, Shen H, Zhang L. Studies on freshwater nanophytoplankton using flow cytometry (FCM)[J]. China Environmental Science, 2002, 22(2): 101-104 (in Chinese)
- [17] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 流式细胞术在水体微型生物研究中的应用[J]. 生物物理学报, 2002, 18(3): 359-364
- Guo P, Shen H, Zhang L. Application of flow cytometry in aquatic microbiota research [J]. Acta Biophysica Sinica, 2002, 18(3): 359-364 (in Chinese)
- [18] 焦念志, 杨燕辉. 四类海洋超微型浮游生物同步监测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 506-511
- [19] 刘建萍, 张玉超, 钱新, 等. 太湖蓝藻水华的遥感监测研究[J]. 环境污染与防治, 2009, 31(8): 79-83 (in Chinese)
- Liu J, Zhang Y, Qian X, et al. Review of cyanobacteria remote sensing in Taihu Lake [J]. Environmental Pollution & Control, 2009, 31(8): 79-83 (in Chinese)
- [20] Xiao J, Xiao H, Huang D. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy[J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50(5): 852-855
- [21] 邵鹏, 袁洁, 陈月琴, 等. 自然水样微型藻类遗传多样性的方法学研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 1-7
- Shao P, Yuan J, Chen Y, et al. Methodological study on the genetic diversity of microalgae in the natural waters [J]. Marine Sciences, 2002, 26(4): 1-7 (in Chinese)
- [22] Gale K R, Crampton J M. DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex [J]. Medical and Veterinary Entomology, 1987, 1(2): 127-136
- [23] Gibson W C, Dukes P, Gashumba J K. Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies [J]. Parasitology, 1988, 97(1): 63-73
- [24] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321
- [25] Newmaster S G N G, Fazekas A J F J, Ragupathy S R. DNA barcoding in land plants: Evaluation of rbcL in a multigene tiered approach [J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84(3): 335-341
- [26] Hollingsworth M L, Andra C A, Forrest L L, et al. Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants.[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(2): 439-457
- [27] Wawrik B, Paul J H, Tabita F R. Real-time PCR quantification of rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3771-3779
- [28] Wilkes R J, Mcivior L M, Guiry M D. The taxonomic position of *Maripelta rotata* (Rhodymeniaceae, Rhodophyta) [J]. Cryptogamie Algologie, 2005, 26(1): 67-75
- [29] Hanyuda T, Arai S, Ueda K. Variability in the rbcL introns of Caulerpallean algae (Chlorophyta, Ulvophyceae) [J]. Journal of Plant Research, 2000, 113(4): 403-413
- [30] Min X J, Hickey D A. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 365-373
- [31] Selvaraj D, Sarma R K, Sathishkumar R. Phylogenetic a-

- analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding [J]. *Bioinformation*, 2007, 3(1): 24-27
- [32] Chase M W, Wilkinson M. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 295-299
- [33] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(3): 480-490
- [34] Hausner G, Olson R, Simon D, et al. Origin and evolution of the chloroplast trnK (matK) intron: A model for evolution of group II intron RNA structures [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23(2): 380-391
- [35] Dayrat B. Towards integrative taxonomy [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 85(3): 407-415
- [36] Blaxter M, Mann J, Chapman T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1935-1943
- [37] Saunders G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: A preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 2005, 360(360): 1879-1888
- [38] Alvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2003, 29(3): 417-434
- [39] Chen S, Hui Y, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *Plos One*, 2010, 5(1): e8613-e8613
- [40] Gao T, Hui Y, Song J, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 1-7
- [41] Pang X, Song J, Zhu Y, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(15): 1784-1786
- [42] Yamaguchi A, Kawamura H, Horiguchi T. A further phylogenetic study of the heterotrophic dinoflagellate genus, *Protoperidinium*, (Dinophyceae) based on small and large subunit ribosomal RNA gene sequences [J]. *Phycological Research*, 2006, 54(4): 317-329
- [43] Moniz M B J, Kaczmarek I. Barcoding of diatoms: Nuclear encoded ITS revisited [J]. *Protist*, 2010, 161(1): 7-34
- [44] Wiel C C M V D, Schoot J V D, Valkenburg J L C H V, et al. DNA barcoding discriminates the noxious invasive species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L. f.), from non-invasive relatives [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(4): 1086-1091
- [45] Vijayan K, Tsou C H. DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective [J]. *Current Science*, 2010, 99(11): 1530-1541
- [46] Dong W, Liu J, Yu J, et al. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding [J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e35071
- [47] Magee A M, Aspinall S, Rice D W, et al. Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes [J]. *Genome Research*, 2010, 20(12): 1700-1710
- [48] Chung-Shien W, Ya-Nan W, Chi-Yao H, et al. Loss of different inverted repeat copies from the chloroplast genomes of Pinaceae and cupressophytes and influence of heterotachy on the evaluation of gymnosperm phylogeny [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2011, 3: 1284-1295
- [49] Kane N, Cronk Q. Botany without borders: Barcoding in focus [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(24): 5175-5176
- [50] Li D, Liu J, Chen Z, et al. Plant DNA barcoding in China [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2011, 49(3): 165-168
- [51] Pennisi E. Wanted: A barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 190-191
- [52] Fazekas A J, Kesanakurti P R, Burgess K S, et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(s1): 130-139
- [53] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *Plos One*, 2007, 3(7): e2802
- [54] Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *Plos One*, 2011, 6(5): e19254
- [55] Heinze B. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants [J]. *Plant Methods*, 2007, 3(1): 1-7
- [56] Parks M, Cronn R, Liston A. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes [J]. *BMC Biology*, 2009, 7(1): 84
- [57] Huang C Y, Martin W. Mutational decay and age of chloroplast and mitochondrial genomes transferred recently to angiosperm nuclear chromosomes [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(3): 1723-1733
- [58] Luo H, Shi J, Arndt W, et al. Gene order phylogeny of the genus, *Prochlorococcus* [J]. *Plos One*, 2008, 3(12): e3837
- [59] Luo H, Sun Z, Arndt W, et al. Gene order phylogeny and the evolution of methanogens [J]. *Plos One*, 2009, 4(6): e6069
- [60] Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, et al. Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole

- chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA [J]. American Journal of Botany, 2012, 99(2): 320-329
- [61] Bayly M J, Rigault P, Spokevicius A, et al. Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts--*Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae) [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2013, 69: 704-716
- [62] Yang J B, Tang M, Li H T, et al. Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: Lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses [J]. BMC Evolutionary Biology, 2013, 13(1): 150-156
- [63] Nock C J, Waters D L, Edwards M A, et al. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 328-333
- [64] Li X, Yang Y, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: From gene to genome [J]. Biological Reviews, 2015, 90(1): 157-166
- [65] Wang W, Wu Y, Yan Y, et al. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 1-11
- [66] Kumar S, Hahn F M, McMahan C M, et al. Comparative analysis of the complete sequence of the plastid genome of *Parthenium argentatum* and identification of DNA barcodes to differentiate *Parthenium* species and lines [J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1): 1-12
- [67] Ahmed I, Matthews P J, Biggs P J, et al. Identification of chloroplast genome loci suitable for high-resolution phylogeographic studies of *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Araceae) and closely related taxa [J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(5): 929-937
- [68] Kuang D Y, Wu H, Wang Y L, et al. Complete chloroplast genome sequence of *Magnolia kwangsiensis* (Magnoliaceae): Implication for DNA barcoding and population genetics [J]. Genome, 2011, 54(8): 663-673
- [69] Becker M, Gruenheit N, Steel M. Hybridization may facilitate *in situ* survival of endemic species through periods of climate change [J]. Nature Climate Change, 2013, 3(12): 1039-1043
- [70] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. [J]. Cell Chemical Biology, 1998, 5(10): 245-249
- [71] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 2045-2050
- [72] Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Metabarcoding, a new way of analysing biodiversity [J]. Biofutur, 2011, 319: 30-32
- [73] Zhan A, Hulák M, Sylvester F, et al. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities [J]. Methods in Ecology & Evolution, 2013, 4(6): 558-565
- [74] Lin S, Zhang H, Hou Y, et al. High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox1* and *cob* genes for dinoflagellate DNA barcoding [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(5): 1279-1290
- [75] Zimmermann J, Glöckner G, Jahn R, et al. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies [J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 15(3): 526-542
- [76] Zaiko A, Martinez J L, Schmidt-Petersen J, et al. Metabarcoding approach for the ballast water surveillance — An advantageous solution or an awkward challenge? [J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 92(1-2): 25-34
- [77] Corse E, Costedoat C, Chappaz R, et al. A PCR-based method for diet analysis in freshwater organisms using 18S rDNA barcoding on faeces [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(1): 96-108
- [78] Saunders G W S W. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Cana [J]. Botany-botanique, 2008, 86(7): 773-789
- [79] Wang L, Zhuang Y, Zhang H, et al. DNA barcoding species in *Alexandrium tamarense*, complex using ITS and proposing designation of five species [J]. Harmful Algae, 2014, 31(1): 100-113
- [80] Buchheim M A, Keller A, Koetschan C, et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: Towards an automated reconstruction of the green algal tree of life [J]. Plos One, 2011, 6(2): e16931
- [81] Destombe C, Valero M, Guillemain M L. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: Resurrection of the species *G. dura* previously described in the Northern Atlantic 200 years ago [J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 720-727
- [82] Levybooth D J, Campbell R G, Gulden R H, et al. Cycling of extracellular DNA in the soil environment [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(12): 2977-2991 ◆