

## 洪湖沉积物中真菌群落结构的垂直分布

赵彦玲 郑世学\* 方治伟 喻子牛

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 微生物农药国家工程研究中心 武汉 430070

**摘要:** 湖泊沉积物中真菌的类群及其作用所知甚少。以长江中上游代表性湖泊洪湖为研究对象, 从湖心截取了一个 72cm 长的沉积柱, 通过 rDNA 内转录间隔区 (ITS) 的变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 对洪湖沉积物中真菌群落结构的垂直变化进行了分析。结果显示, DGGE 条带以 14-18cm 层次为过渡, 在 2-14cm 和 14-72cm 之间存在一定差异。Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 在上下层之间有波动。聚类分析上层 2-18cm 和中下层 18-72cm 分别以不同的小类聚在一起。表明 14-18cm 以上和以下的类群存在差异, 即随深度增加真菌群落结构有明显变化。真菌主要类群属于子囊菌门 Ascomycota 和担子菌门 Basidiomycota。子囊菌门是真菌的主导类群, 占有类群总量的 70%。子囊菌门包括酵母菌亚门 Saccharomycotina 和盘菌亚门 Pezizomycotina; 担子菌门包括异担子菌纲 Heterobasidiomycetes, 黑粉菌纲 Ustilaginomycetes 和未分类的担子菌 unclassified Basidiomycota。

**关键词:** 内转录间隔区 (ITS), 变性梯度凝胶电泳 (DGGE), 子囊菌门, 担子菌门

## Vertical distribution of fungal communities in Honghu Lake sediment

ZHAO Yan-Ling ZHENG Shi-Xue\* FANG Zhi-Wei YU Zi-Niu

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** The fungal communities and their function in lake sediments are poorly understood. In this study, Honghu Lake, a representative lake at the middle and upper reaches of the Yangtze River, was selected as the sampling place. A 72cm sediment core was obtained from the center of the lake to investigate the vertical changes of fungal community structures by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of internal transcribed spacer (ITS) of rDNA. DGGE profiles had some differences between the samples from the depth regions of 2-14cm and 14-72cm with the 14-18cm region as the transition point. The Shannon-Weaver index ( $H'$ ) fluctuated at different depths. Clustering analysis showed that the depth regions of upper 2-18cm and 18-72cm were clustered into separate clades with different subclasses. The results indicated that the fungal communities were different between the

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2009PY013)

\*Corresponding author. E-mail: zhengsx@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2011-04-02, 接受日期: 2011-07-20

depth regions of 2–14cm and 14–72cm, *i.e.* the fungal groups changed obviously with depths. The fungal communities mainly included the species of Ascomycota and Basidiomycota, and the species of Ascomycota dominated in the sediment, which accounted for 70% of the detected groups. The ascomycotes were mainly in the subphyla of Saccharomycotina and Pezizomycotina. The Basidiomycota phylum included Heterobasidiomycetes, Ustilaginomycetes and unclassified Basidiomycota.

**Key words:** internal transcribed spacer (ITS), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Ascomycota, Basidiomycota

核糖体 rDNA 的内转录间隔区 (ITS) 不加入成熟核糖体, 在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 进化速率较快, 在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性, 即使是亲缘关系非常接近的两个种都能在 ITS 序列上表现出差异, 这就为 ITS 序列在微生物种类鉴定和群落结构分析中的应用奠定了理论基础 (García-Martínez *et al.* 1999)。ITS1 和 ITS2 是中度保守区域, 其保守性表现为种内相对一致, 种间差异比较明显。此外, ITS 序列长度适中, 易于分析, 人们可以从不太长的序列中获得足够的信息, 这些特点使 ITS 序列适用于真菌物种的分子鉴定以及属内种间类群的系统发育分析 (Deng *et al.* 2008)。目前, 基于 ITS 序列分析的分子生物学技术在土壤 (Anderson & Parkin 2007; Bastias *et al.* 2007)、海洋 (Gao *et al.* 2008; Harvey & Goff 2010) 和反刍动物消化道 (成艳芬等 2007) 真菌群落结构研究中得到广泛应用, 而在沉积物真菌群落结构的研究中尚未得到普遍应用 (Lai *et al.* 2007)。

沉积物是集化学物质和微生物于一体的特殊生态环境。据统计, 沉积物中微生物的生物量占全球总生物量的 1/3 (Whitman *et al.* 1998), 它们在全球生态平衡中发挥了重要作用 (Knittel & Boetius 2009)。由于沉积物本身的特点和微生物机体代谢效率的不同, 沉积物中微生物的群落结构表现出明显的深度相关性 (Macalady *et al.* 2008; Rocap *et al.* 2003)。Koizumi *et al.* (2003, 2004) 和 Ye *et al.* (2009) 对沉积物中细菌和古菌群落结构随深度的变化进行了深入研究, 但沉积物中真菌群落结构随深度变化的研究比较少 (Coolen & Shtereva 2009)。

洪湖地处长江中游北岸, 是典型的过水型湖

泊, 受长江水系的影响比较大, 尤其是 1998 年长江发生特大洪水。洪湖流域降雨量充沛, 地表径流、地下水和过境水十分丰富。洪湖历史上经历了多次变迁, 生态环境具有一定的复杂性和特殊性 (方敏等 2006; 庐山等 2004)。本研究通过 rDNA ITS 的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 对洪湖沉积物中真菌的类群多样性进行了研究, 旨在揭示洪湖沉积物中不同深度真菌的类群组成及其群落结构的垂直变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

沉积物样品采自于洪湖西半湖中心 (29°51.311'N, 13°18.656'E), 使用静压沉积物柱采样器 (MT-2; Rigosya, 日本) 垂直取样, 取样点水深 3m, 所取的沉积物柱子长度为 72cm。沉积柱取出后立即密封, 放于冰上并迅速带回实验室。2–22cm 每 4cm 间隔为一个样, 22–72cm 每 5cm 间隔为一个样, 共 15 个样品。

### 1.2 样品总 DNA 的提取

采用 Soil Master™ DNA Extraction Kit (Epicentre 公司, 瑞士) 从 0.1g 沉积物样品中提取总 DNA, 抽提前先将各个层次的沉积物样品分别在采样袋内充分混匀以减少取样误差。具体抽提过程参照试剂盒说明进行, 最后用 30μL 去离子水溶解总 DNA。

### 1.3 真菌 rDNA 的 ITS 序列的巢氏 PCR 扩增

应用 S1000™ thermal cycler (BIO-RAD, 美国) 进行 PCR 扩增。以提取的总 DNA 为模板, ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Prat *et al.*

2009) 为引物进行巢氏 PCR 第一轮扩增。PCR 体系: 无菌双蒸水 17 $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (含 MgCl<sub>2</sub>) 2.5 $\mu$ L, dNTPs (各 2.5mmol/L) 2.0 $\mu$ L, 引物 1 (10 $\mu$ mol/L) 和引物 2 (10 $\mu$ mol/L) 各 0.5 $\mu$ L, *Taq* 酶 (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, DNA 模板 (10ng/ $\mu$ L) 2.0 $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min; 55 $^{\circ}$ C 退火 45s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min (30 个循环); 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。第二轮 PCR 扩增以第一轮 PCR 产物稀释 100 倍为模板, 所用引物为 ITS1-F 和 ITS-2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Doaré-Lebrun *et al.* 2006), GC 夹子 (5'-CGCCCGGGGCGCGCC CCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3') 加到 ITS-2 的 5'端。PCR 体系和条件与第一轮相同, 退火温度为 62 $^{\circ}$ C。用 AxyPrep<sup>TM</sup> PCR Cleanup Kit (Axygen, 美国) 对 PCR 产物进行纯化。

#### 1.4 变性梯度凝胶电泳

将纯化后的 PCR 产物用 BIO-RAD 公司 DCode<sup>TM</sup> System 梯度凝胶电泳仪进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE)。使用 40% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺凝胶 (37.5:1), 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE, 胶浓度为 8%, 变性梯度为 30%—60%。电压 60V, 60 $^{\circ}$ C, 电泳 16h, 银染 (Heuer *et al.* 1999)。染色后用照相机拍照。

#### 1.5 DGGE 条带的 Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 和聚类分析

用 Quantity One 软件 (BIO-RAD) 分析 DGGE 图谱, 计算各个样品的 Shannon-Weaver index ( $H'$ )。  $H' = -\sum (n_i/N) \log (n_i/N) = -\sum p_i (\log p_i)$  ( $n_i$  是每个条带的光密度值,  $N$  是一个泳道所有条带的光密度之和) (Koizumi *et al.* 2003)。依据每个泳道 DGGE 条带的相似性对所有样品进行聚类分析, 采用 UPGMA (Quantity One 软件) 的方法。

#### 1.6 DGGE 条带的回收测序与系统发育分析

①将 DGGE 条带用灭菌刀片切割, 放到 1.5mL 离心管中并捣碎, 加入 50 $\mu$ L 回收缓冲液 (0.5mol/L 乙酰胺, 10mmol/L 乙酸镁, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS), 37 $^{\circ}$ C 水浴 5h, 12,000r/min 离心 10min。②取上清液做模板, 用不带 GC 夹子的引物 ITS1-F/ITS-2

进行 PCR 扩增。PCR 体系及条件按 1.3 节所述方法进行, 用 AxyPrep<sup>TM</sup> PCR Cleanup Kit (Axygen, 美国) 对 PCR 产物进行纯化。③纯化后的 PCR 产物用 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 日本) 进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 挑阳性克隆子。由华大基因研究院进行测序 (ABI3730 测序仪)。④所有测序结果去除载体序列, 将目的片段在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 找出其最高相似性序列, 用 Clustal W 进行序列比对分析 (MEGA 4.1), 采用邻接 (neighbor-joining) 法构建系统发育树。真菌所有序列的 GenBank 登录号为 JF734728—JF734844。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

将样品总 DNA 用 1% 的琼脂糖胶电泳检测, 发现所有样品均没有明显条带。将提取的总 DNA 进行巢氏 PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖胶电泳检测, 第一轮 PCR 反应均获得特异性扩增片段, 长度为 750bp; 第二轮 GC-PCR 产物大小在 350bp 左右。

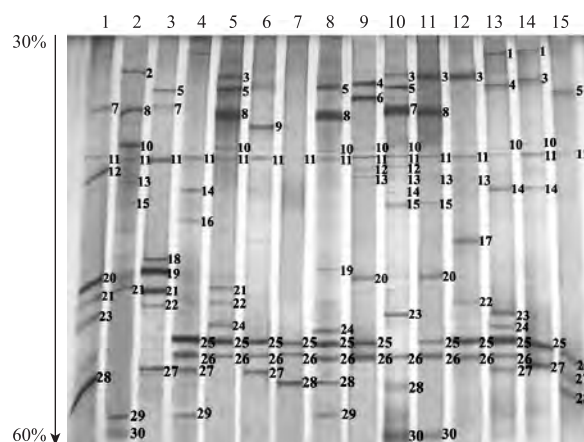


图 1 洪湖沉积物真菌 ITS 区 PCR 产物变性梯度凝胶电泳图谱

Fig. 1 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of fungal ITS PCR products for different depth's samples of Honghu Lake sediments. 1: 2—6cm; 2: 6—10cm; 3: 10—14cm; 4: 14—18cm; 5: 18—22cm; 6: 22—27cm; 7: 27—32cm; 8: 32—37cm; 9: 37—42cm; 10: 42—47cm; 11: 47—52cm; 12: 52—57cm; 13: 57—62cm; 14: 62—67cm; 15: 67—72cm. Vertical arrow indicates that the denaturant gradient increases from 30% on the top to 60% on the bottom of the gel.

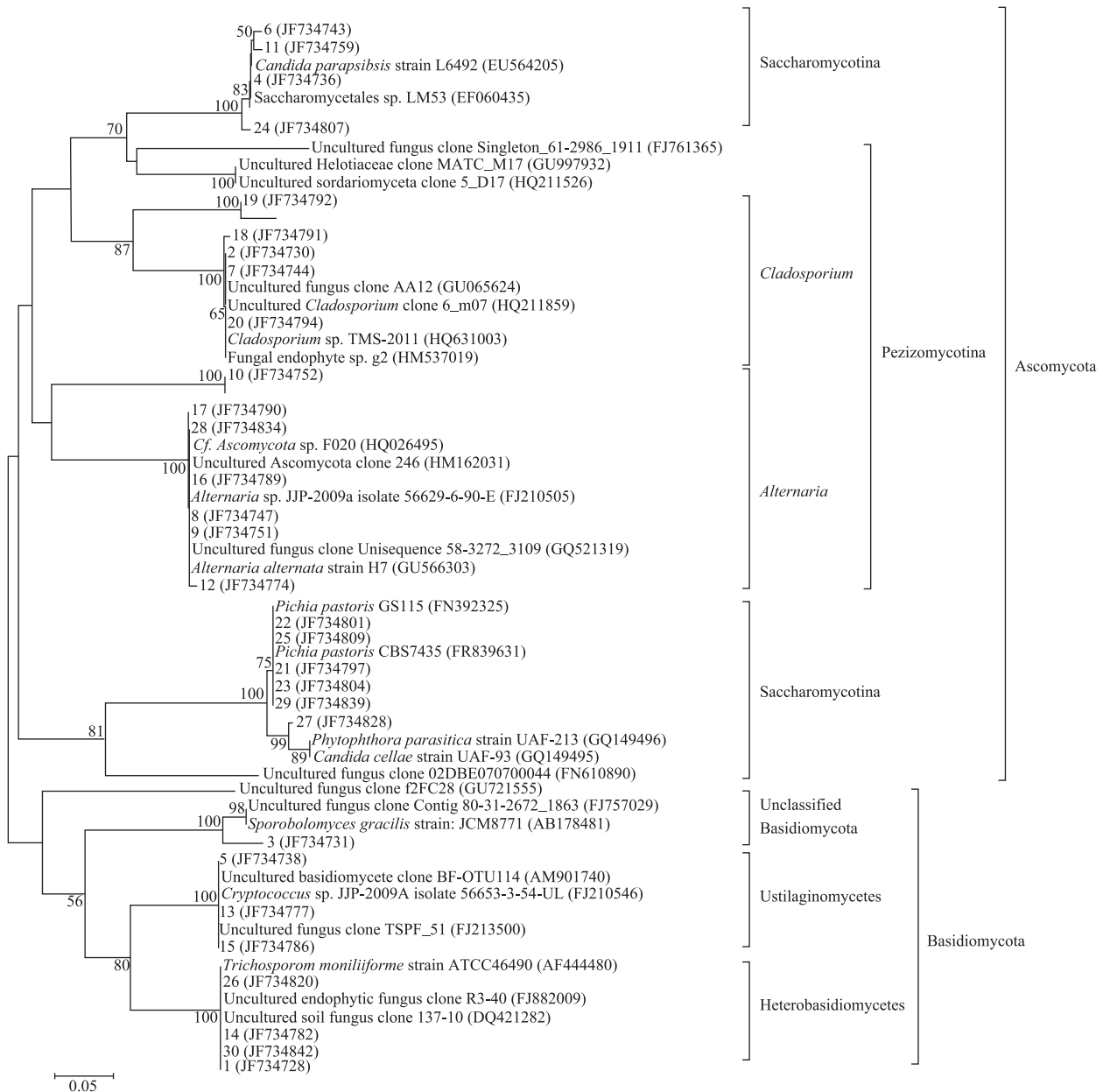


图 2 利用邻接法对洪湖沉积物真菌 ITS 区 DGGE 回收的条带构建系统发育树 克隆序列的编号见图 1 条带编号。

Fig. 2 Affiliation of sequenced ITS DGGE fragments in Honghu Lake sediment. The neighbour-joining tree was constructed using MEGA. Bootstrap analysis was conducted using 1000 replicates. Bootstrap values are shown for branches with >50%. Identification of DGGE bands was shown in Fig. 1.

## 2.2 真菌 ITS 区 DGGE 图谱及回收条带的系统发育分析

真菌 rDNA 的 ITS 区 DGGE 图谱见图 1。从 DGGE 图谱中可以看出，每个样品能检测到十几个条带，并且以 14–18cm 层次为过渡，2–14cm 和 14–72cm 之间的条带有一定差异，表明真菌群落

结构随深度增加有一定变化。将代表性条带切胶回收并测序，共得到 30 条序列（序列编号对应条带见图 1）。将所得序列进行系统进化分析，构建系统发育树（图 2）。系统进化分析显示，真菌主要类群包括子囊菌门 Ascomycota 和担子菌门 Basidiomycota。其中，子囊菌门包括酵母菌亚门

Saccharomycotina 和盘菌亚门 Pezizomycotina; 担子菌门包括异担子菌纲 Heterobasidiomycetes, 黑粉菌纲 Ustilaginomycetes 和未分类的担子菌 unclassified Basidiomycota 三个亚类。子囊菌门对应条带占条带总数的 70%, 子囊菌门中酵母菌亚门数量最多, 对应条带数目占条带总数的 43.7%。

条带 11 是所有深度样品共有的, 属于酵母菌亚门 Saccharomycotina, 代表了所有深度样品共有的类群。它与 Saccharomycetales sp. 克隆子 LM53 (EF060435) 的相似性为 99%。条带 25 和 26 几乎是 14–72cm 每个深度都有的条带, 并且条带比较亮, 因此代表了 14–72cm 样品的优势类群, 也是分布比较广泛的类群。条带 25 属于酵母菌亚门 Saccharomycotina, 与 *Pichia pastoris* GS115 (FN392325) 的相似性为 99%。条带 26 属于异担子菌纲 Heterobasidiomycetes, 与未可培养的土壤真菌克隆子 137-70 (DQ421282) 的相似性为 99%。条带 21 和 29 都属于酵母菌亚门 Saccharomycotina, 是上层 2–37cm 的某些层次含有的, 而条带 3 (unclassified Basidiomycota), 13 (Ustilaginomycetes), 14 (Heterobasidiomycetes) 和 28 (*Alternaria*) 对应的类群在下层的含量比较多。另外, 还出现了一些特殊的条带。如条带 6 (Saccharomycotina) 只在 37–42cm 含有; 条带 2, 18 (*Cladosporium*) 和 9, 16, 17 (*Alternaria*), 它们分别只在 6–10cm, 10–14cm, 22–27cm, 14–18cm 和 52–57cm 含有。

### 2.3 真菌 DGGE 图谱的 Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 多样性指数及聚类分析

ITS 区 DGGE 图谱的 Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 多样性指数及聚类分析见图 3 和图 4。 $H'$  的变化范围是 0.76–1.03, 在上下层之间呈现一定波动。其中,  $H'$  在 42–47cm 和 47–52cm 两个层次达到最大值, 最深层 67–72cm 值最小。聚类分析显示, 上层 2–18cm 和中下层 18–72cm 的样品分别以不同的小类聚在一起。表明以 14–18cm 为过渡, 14–18cm 以上和以下的类群存在差异。

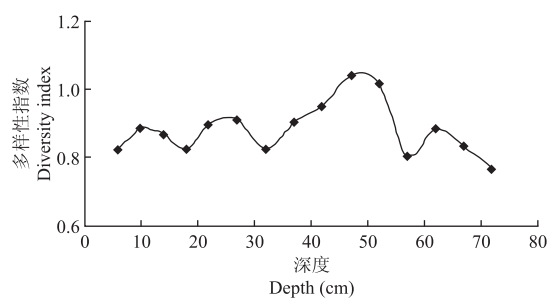


图 3 基于 rDNA ITS 区 PCR-DGGE 得到的真菌 Shannon-Weaver index ( $H'$ ) 随深度的垂直变化

Fig. 3 Vertical changes of fungal Shannon-Weaver index ( $H'$ ) in Honghu Lake sediments based on PCR-DGGE of ITS.

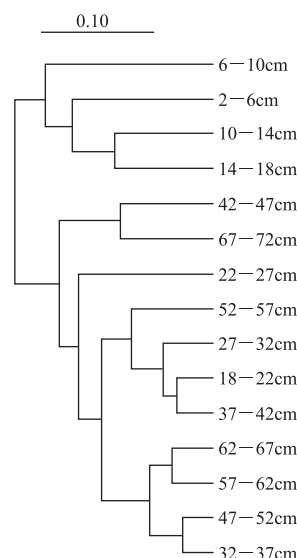


图 4 真菌 rDNA 的 ITS PCR-DGGE 聚类图谱

Fig. 4 Dendrograms constructed from fungal DGGE profiling of PCR-amplified rDNA. UPGMA of Quantity One software was used for dendrogram construction.

## 3 讨论

本研究首次对洪湖沉积物中真菌群落结构的垂直变化进行了分析, 为洪湖沉积物中微生物多样性的研究提供了新的线索。DGGE 图谱和聚类分析 (图 1 和图 4) 都显示, 72cm 以内沉积物中真菌群落结构随深度增加有明显变化。但是, 更深层中真菌群落结构的变化规律是否与此相同还有待进一步研究。系统进化分析 (图 2) 表明, 子囊菌门是洪湖沉积物中真菌的主导类群, 并且子囊菌门和担

子菌门分别包括了几个亚类。O'Brien *et al.* (2005) 对 Duke 森林中土壤样品进行了大规模测序, 发现深层土壤中的主要类群是菌根真菌 Mycorrhiza, 而表层土壤中主要是一些腐生真菌。印度中部盆地深海沉积物中的真菌主要是曲霉 *Aspergillus* 和不产孢子的类群 (Damare *et al.* 2006)。Gao *et al.* (2008) 对夏威夷海洋海绵中真菌的类群进行了研究, 发现子囊菌门包括煤炱目 Capnodiales, 座囊菌目 Dothideales, 格孢菌目 Pleosporales 和肉座菌目 Hypocreales 等 7 个亚类; 担子菌门包括伞菌目 Agaricales, 多孔菌科 Polyporales 和伏革菌科 Corticales 等 4 个亚类。由此可见, 洪湖沉积物中的真菌类群与土壤和海洋中的真菌类群明显不同。

PCR-DGGE 技术以其直观、灵敏和能够同时检测大量样品等优点成为研究微生物类群多样性最常用的方法之一, 几个碱基的差别就足以引起 DGGE 胶中 DNA 序列迁移位置的不同 (Nocker *et al.* 2007)。本研究中, DGGE 图谱中条带 8, 9, 16 和 28 迁移位置不同 (图 1), 测序分析证明彼此间有 1—5 个碱基的差别, 这也印证了 PCR-DGGE 技术的灵敏性; 但系统进化分析都属于 *Alternaria* 属真菌 (图 2), 且与一些未培养真菌的序列相似性很高, 还不足以区分到更小的分类单元, 因此, 在系统发育树中其遗传距离也不能相互区分开。另外, 类似的还有, DGGE 图谱中条带 1, 14, 26, 30 (Heterobasidiomycetes) 和 21, 22, 23, 25, 29 (Saccharomycotina) 在系统进化分析中也分别聚为一类 (图 1 和图 2)。

根据洪湖沉积物  $^{210}\text{Pb}$  定年, 72cm 长的沉积柱大约沉积了一百多年 (王伟等 2006)。在沉积柱的每个深度都检测到有真菌存在, 即一百多年的沉积过程中都有真菌存在, 这些真菌类群是以何种状态存在是一个有趣的问题。日本 Biwa 湖沉积物中有活性的和总的细菌类群有明显差异, 而古菌有活性的和总的类群却很相似 (Koizumi *et al.* 2003, 2004)。关于真菌活性类群和总类群之间关系的研究比较少 (Bastias *et al.* 2007), Bastias *et al.* (2007) 通过 RNA 和 DNA 的 DGGE 发现, 澳大利亚桉树

林土壤中有活性的和总的真菌类群明显不同。反刍动物瘤胃中总的真菌类群很丰富, 但只有厌氧真菌可以在瘤胃内定殖 (成艳芬等 2007)。Damare *et al.* (2006) 在 5,000m 的深海沉积物中发现有活的真菌存在, 他们认为陆地上的真菌类群沉积到海底并逐渐适应了深海的极端环境。后退冰河前沿的无植被区土壤真菌群落的新生层有活体营养型真菌存在, 可能是由于新生层中有休眠的孢子库 (Jumpponen 2003)。洪湖沉积物中是否存在有活性的真菌类群, 检测到的子囊菌和担子菌是一些历史沉积的真菌孢子, 还是适应沉积物环境的活性类群, 以及这些类群的作用, 这些问题都需要进一步去研究。

Coolen & Shtereva (2009) 发现黑海水体和表层沉积物中有活性的真菌类群多样性随深度有明显变化, 他们认为这一现象主要与黑海中营养元素和氧化还原电位的梯度变化有关。其他研究也表明, 影响环境中真菌数量和多样性的主要因素是 pH、有机物含量及水分 (Pan *et al.* 2008)。据报道, 洪湖沉积物中不同深度总有机碳 (TOC)、总氮 (TN) 和总磷 (TP) 等的含量有明显变化, 并且根据  $^{210}\text{Pb}$  对沉积柱沉积年龄的测定, 沉积柱 22—24cm 恰好对应长江发生特大洪水的 1998 年 (王伟等 2006; 陈萍等 2004)。但 22—24cm 深度的真菌类群与其他层次相比没有明显差异, 因此 1998 年长江特大洪水对洪湖沉积物中真菌群落结构的影响比较小, 并且真菌的类群多样性与营养元素 TOC、TN 和 TP 的关系不大。

致谢: 感谢中国地质大学 (武汉) 环境学院祁士华教授等对采样提供的支持。

## [REFERENCES]

- Anderson IC, Parkin PI, 2007. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2): 248-253
- Bastias BA, Anderson IC, Xu Z, Cairney JWG, 2007. RNA- and DNA-based profiling of soil fungal communities in a native Australian eucalypt forest and adjacent *Pinus elliotti* plantation.

- Soil Biology & Biochemistry*, 39(12): 3108-3114
- Chen P, He BY, Yuanteng BY, Du Y, Li SJ, 2004. Records of human activities in sediments from Honghu Lake. *Journal of Lake Science*, 16(3): 233-237 (in Chinese)
- Cheng YF, Mao SY, Zhu WY, 2007. Ecological functions and advances in molecular biology of anaerobic fungi. *Biotechnology Bulletin*, 1: 70-73 (in Chinese)
- Coolen MJL, Shtereva G, 2009. Vertical distribution of metabolically active eukaryotes in the water column and sediments of the Black Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(3): 525-539
- Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S, 2006. Fungi in deep-sea sediments of the central Indian basin. *Deep-Sea Research I*, 53(1): 14-27
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M, 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*, 35(2): 265-274
- Doaré-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guérin L, Pernelle JJ, Ogier JC, Bouix M, 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis-potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6): 1340-1350
- Fang M, Qi SH, Wu CX, Hu LS, Su QK, 2006. High resolution sedimentary record of organochlorine pesticides in sediments core from Honghu Lake. *Geological Science and Technology Information*, 25(3): 89-92 (in Chinese)
- Gao Z, Li B, Zheng C, Wang G, 2008. Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian Marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19): 6091-6101
- García-Martínez J, Acinas SG, Antón AI, Rodríguez-Valera F, 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2): 55-64
- Harvey JBJ, Goff LJ, 2010. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of north America. *Fungal Biology*, 114(1): 82-95
- Heuer H, Hartung K, Wieland G, Kramer I, Smalla K, 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1045-1049
- Jumpponen A, 2003. Soil fungal community assembly in a primary successional glacier forefront ecosystem as inferred from rDNA sequence analyses. *New Phytologist*, 158(3): 569-578
- Knittel K, Boetius A, 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, 63: 311-334
- Koizumi Y, Takii S, Fukui M, 2004. Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2): 285-292
- Koizumi Y, Takii S, Nishino M, Nakajima T, 2003. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(1): 101-108
- Lai X, Cao L, Tan H, Fang S, Huang Y, Zhou S, 2007. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. *The ISME Journal*, 1(8): 756-762
- Lu S, Li SJ, Wang XL, 2004. Study on the environmental evolution and ecological protection of Honghu Lake. *Wetland Science*, 2(3): 234-237 (in Chinese)
- Macalady JL, Dattagupta S, Schaperdoth I, Jones DS, Druschel GK, Eastman D, 2008. Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *The ISME Journal*, 2(6): 590-601
- Nocker A, Burr M, Camper AK, 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2): 276-289
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R, 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*,

71(9): 5544-5550

Pan HQ, Yu JF, Wu YM, Zhang TY, Wang HF, 2008. Diversity analysis of soil dematiaceous hyphomycetes from the Yellow River source area: I. *Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 9(10): 829-834

Prat C, Ruiz-Rueda O, Trias R, Anticó E, Capone D, Sefton M, Bañeras L, 2009. Molecular fingerprinting by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis reveals differences in the levels of microbial diversity for musty-earthly tainted corks. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 1922-1931

Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW, 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952): 1042-1047

Wang W, Qi SH, Wu CX, Zhang JG, Fang M, Zhang FN, 2006. Sedimentary flux of heavy metals residues in sedimentary core: case study in Honghu Lake. *Environmental Science & Technology*,

29(10): 41-43 (in Chinese)

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12): 6578-6583

Ye W, Liu X, Lin S, Tan J, Pan J, Li D, Yang H, 2009. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(2): 107-120

#### [附中文参考文献]

陈萍, 何报寅, 远藤邦彦, 杜耘, 李世杰, 2004. 洪湖人类活动的沉积物记录. *湖泊科学*, 16(3): 233-237

成艳芬, 毛胜勇, 朱伟云, 2007. 厌氧真菌生态作用及其分子生物学研究进展. *生物技术通报*, 1: 70-73

方敏, 祁士华, 吴辰熙, 胡立嵩, 苏秋克, 2006. 洪湖沉积物柱芯有机氯农药高分辨率沉积记录. *地质科技情报*, 25(3): 89-92

庐山, 李世杰, 王学雷, 2004. 洪湖的环境变迁与生态保护. *湿地科学*, 2(3): 234-237

王伟, 祁士华, 吴辰熙, 张俊刚, 方敏, 张菲娜, 2006. 元素沉积通量在重金属高分辨率沉积记录中应用——以洪湖为例. *环境科学与技术*, 29(10): 41-43