

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53 (11) :1149 – 1157; 4 November 2013  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 不同自然环境下噬藻体 *g20* 基因多样性研究进展

荆瑞勇<sup>1,2,3</sup>, Makoto Kimura<sup>4</sup>, 王光华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院黑土区农业生态重点实验室, 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

<sup>3</sup>黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319

<sup>4</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

**摘要:**随着分子生物学技术发展与病毒基因组测序的推进,对地球上数量最大且广泛存在的病毒及其基因多样性的研究备受科学家们关注。迄今为止,仍未发现类似于细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 的病毒通用分子标记,但利用病毒某些家族的保守氨基酸序列设计简并性引物可研究环境中病毒多样性,并取得了一系列突破性成果。本文以编码噬藻体壳组装蛋白基因 *g20* 为目标,综述了噬藻体在海洋、湖泊和稻田中噬藻体基因多样性的研究进展,讨论了噬藻体 *g20* 基因分布与生存环境的相关性,发现不同的自然环境中都存在着独特的类群。同时指出了针对环境中噬藻体 *g20* 基因研究存在的问题及未来研究发展的趋势。

**关键词:**噬藻体, *g20* 基因, 病毒生态, 海洋, 湖泊, 稻田

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1149-09

病毒是地球上最为丰富的生命体,它在自然环境中丰度大,且多样性丰富,引起世界各国科学家们的兴趣<sup>[1]</sup>。病毒通过裂解其寄主来调节环境中微生物的物种多样性、群落分布及群落结构,影响地球生物圈营养物质循环,在生物地球化学循环中起到重要的作用<sup>[2-4]</sup>。与环境中其它有细胞结构的微生物遗传多样性不同,对环境中病毒基因多样性的研究困难很大。因为到目前为止,尚未在病毒中发现诸如原核生物 16S rDNA 和真核 18S rDNA 的共有保守序列,用于遗传多样性研究。但最近研究发现,一些噬菌体家族的结构或功能蛋白质氨基酸片段序列高度保守,利用这些保守序列设计简并性引物,可

直接 PCR 扩增出不同噬菌体家族基因序列,进而对自然环境中噬藻体遗传多样性及系统进化等方面进行研究。这些基因包括编码噬藻体壳组装蛋白的 *g20* 基因<sup>[5]</sup>、T7 型噬菌体 DNA 合成酶 *pol* 基因<sup>[6]</sup>、噬藻体编码光合蛋白 D1 的 *psbA* 基因<sup>[7]</sup> 以及 T4 型噬菌体主要壳蛋白的 *g23* 基因<sup>[8]</sup>。前文对自然环境中 T4 型噬菌体 *g23* 基因多样性研究进展已进行了综述<sup>[9]</sup>,本文以编码噬藻体衣壳组装蛋白基因 *g20* 为分子标记,综述近年来海洋、湖泊和稻田等环境中噬藻体该基因多样性的研究进展,目的进一步明晰噬藻体的生态学作用及其与寄主的关系,促进藻类病毒生态学研究发展。

**基金项目:**国家自然科学基金(41271262,31300425);中国科学院“百人计划”项目

\* 通信作者。Tel: +86-451-86602745; Fax: +86-451-86603736; E-mail: [guanghuawang@hotmail.com](mailto:guanghuawang@hotmail.com); [wanggh@neigaehrb.ac.cn](mailto:wanggh@neigaehrb.ac.cn)

**作者简介:**荆瑞勇(1978-),男,内蒙古人,博士研究生,讲师,主要从事微生物生态研究。Tel: +86-451-86602737; E-mail: [jry\\_2002@126.com](mailto:jry_2002@126.com)

收稿日期:2013-03-08;修回日期:2013-04-18

## 1 蓝藻及噬藻体

蓝藻是一类原核光合自养生物,广泛分布在不同的自然环境中。作为初级生产力蓝藻在全球碳循环中起重要作用,水环境中碳固定量的 20% - 80% 主要来自于蓝藻<sup>[10]</sup>。一些蓝藻具有固氮功能,在氮循环中也具有重要作用,尤其在寡营养的海洋环境中<sup>[11]</sup>。土壤中生存的蓝藻可提高土壤肥力,使作物增产<sup>[12]</sup>。蓝藻还是荒漠生境结皮的主要生物,在防止荒漠土壤表面侵蚀、保持土壤水分、改善土壤养分等方面起到重要作用<sup>[13]</sup>。蓝藻具有好的作用一面,也具有不好的一面。某些蓝藻菌株可产生蓝藻毒素,对其它生物具有毒性,蓝藻的大量繁殖在淡水水体中形成“水华”,在海洋中形成“赤潮”,威胁到环境生态安全。海洋生境中的蓝藻主要以单细胞蓝藻,如聚球藻 (*Synechococcus*) 和原绿球藻 (*Prochlorococcus*) 为主<sup>[14]</sup>,而淡水环境中蓝藻主要以丝状蓝藻为主要存在形式<sup>[15]</sup>。

侵染蓝藻的病毒称为蓝藻病毒,也称为噬藻体。噬藻体的研究始于 20 世纪 60 年代,1963 年 Safferman 和 Morris<sup>[16]</sup> 成功分离出第一株噬藻体 LPP,其寄主是鞘丝藻 (*Lyngbya*)、织线藻 (*Plectonema*)、席藻 (*Phormidium*)。之后其他学者从污水沟、池塘、稻田等水体中分离获得多株噬藻体,并对其形态、大小等生物学特性及与宿主相互关系进行了研究<sup>[17-18]</sup>。此阶段对噬藻体的研究着重于对其分离、生物学和生态学特性的研究。不同环境下蓝藻菌群多样性存在着差异,噬藻体除影响其

寄主菌群组成外,还可通过基因重组或溶源性转化影响着寄主遗传多样性<sup>[4,19]</sup>。噬藻体均是 dsDNA 病毒,按其病毒颗粒的形态可分为肌尾病毒科 (*Myoviridae*)、短尾病毒科 (*Podoviridae*) 和长尾病毒科 (*Siphoviridae*)<sup>[20]</sup>。噬藻体作为一类不可忽视的战略生物资源,对其新菌株的探索、遗传多样性及其群落结构组成的研究,有助于人们更清楚地认识现有生物资源状况,明晰生物进化及其在生态系统中的作用,从而为采取更为适当的保护策略和合理利用现有资源提供理论指导<sup>[21-22]</sup>。近 20 年来,随着分子生物学技术及噬藻体基因组测序的发展,学术界对噬藻体遗传多样性的研究取得了显著性的进展。

## 2 噬藻体遗传基因多样性研究的分子标记——g20 基因

g20 基因是编码大肠杆菌 T4 型噬菌体衣壳组装蛋白基因的同源物,已被广泛用于噬蓝藻肌尾科病毒多样性的研究<sup>[5,23-38]</sup>。用于 g20 基因 PCR 扩增的引物有很多(表 1),这些引物的扩增范围、扩增片段大小和简并性存在一定差异。1998 年,Fuller 等<sup>[23]</sup>首次依据 S-PM2, S-WHM1 和 S-BnM1 三株噬藻体 g20 基因的保守序列设计简并性引物 CPS1/CPS2,对环境中噬藻体丰度进行监测,但此对引物因扩增片段较小(165 bp)无法对 g20 基因序列进行系统发生分析。2002 年,Zhong 等<sup>[5]</sup>设计出引物 CPS1/CPS8,成功地从噬藻体分离株和环境病毒浓缩物样品中获得 g20 基因,扩增片段长度 592 bp,可

表 1. 研究噬藻体分子标记 g20 基因的 PCR 引物

Table 1. Primers sets of g20 gene as a molecular marker for study of cyanophage diversity

Primers set	Sequence * (5'→3')	PCR condition	Fragment length/bp	Reference
CPS1/CPS2	GTAGWATTTTCTACATTGAYGTTGG GGTARCCAGAAATCYTCMAGCAT	94°C 5min; 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min (35cycles); 72°C 5min	165	[23]
CPS1/CPS4	GTAGWATTTTCTACATTGAYGTTGG CATWTCWTCCTCAHTCTTC	94°C 2min; 94°C 45s, 30°C 45s, 72°C 1min (32 cycles); 72°C 4min	430	[24]
CPS1/CPS8	GTAGWATTTTCTACATTGAYGTTGG AAATAYTTDDCAACAATGGA	94°C 3min; 94°C 45s, 50°C 1min, ramping at 0.3°C /s 73°C 1min (35cycles); 73°C 4min	592	[5], [24]
CPS4**/G20-2	GTAGAATTTTCTACATTGATGTTGG SWDAAATAYTTICGRACRWAKGGATC	94°C 1.5min; 94°C 15s, 46°C 15s, 72°C 45s (35cycles); 72°C 5min	592	[25]
CPS1.1/CPS8.1	GTAGWATWTTYTAYATTGAYGTWGG ARTAYTTDDCCDAYRWAAGGWTCTC	96°C 1min; 96°C 10s, 35°C 30s, 72°C 20s (35cycles); 72°C 10min	592	[31]

\* The degenerate nucleotide in the table indicated as, D: G/A/T; Y: C/T; M: C/A; H: A/T/C; R: G/A; S: G/C; W: A/T; I: inosine; K: G/T. \*\*CPS4 is a non-degenerate primer which was derived from primer CPS1.

进行系统发生分析。对分离到的不同类型噬菌体采用该引物扩增发现, 这对引物仅能扩增出噬蓝藻肌尾病毒科的噬藻体, 而对其他的长尾病毒科或短尾病毒科及其他噬菌体不能获得。Marston 等<sup>[24]</sup> 比较了 3 对引物的扩增范围发现, CPS1/CPS2 引物扩增范围较 CPS1/CPS4 和 CPS1/CPS8 更加广泛。从引物的简并性来讲, 与非简并性引物比较, CPS1 具有 4 倍的简并性, CPS8 具有 12 倍简并性, G20-2 具有 256 倍的简并性, 并且包含有一个喙残基, 使 CPS4/G20-2 这对引物的简并性达 1024 倍<sup>[25]</sup>。CPS4/G20-2 和 CPS1.1/CPS8.1 这两对引物是基于引物 CPS1/CPS8 衍生出来的, 3 对引物扩增部位和扩增产物长度相同, 只是简并性不同<sup>[26]</sup>。

### 3 自然环境中噬藻体 *g20* 基因多样性

#### 3.1 海洋中噬藻体 *g20* 基因多样性

蓝藻是海洋生态系统初级生产的重要成员, 所以对噬藻体的研究一直是海洋生物学家研究的热点课题。到目前为止, 对噬藻体 *g20* 基因多样性的研究主要集中在海洋生态系统, 包括大西洋、极地海洋、太平洋、加拿大不列颠哥伦比亚海湾、切萨皮克海湾、波罗的海、马尾藻海及我国青岛近海海域等。1998 年, Fuller 等<sup>[23]</sup> 首次设计了引物 CPS1/CPS2, 对海洋噬藻体 *g20* 基因进行 PCR 扩增, 来定量监测水体环境中的蓝藻病毒的丰度, 拉开了对自然环境中噬藻体基因多样性研究的帷幕。2002 年, Zhong 等<sup>[5]</sup> 设计引物对 CPS1/CPS8, 成功地对海洋中分离的噬藻体及自然环境中噬藻体集合体的 *g20* 基因进行 PCR 扩增, 系统发生分析表明海洋噬藻体基因多样性丰富, 彼此间亲缘关系比 T4 噬菌体更近些。在得到的 9 个系统发生簇中, 只有 3 个簇包括已分离获得的噬藻体 (Cluster I、II 和 III), 而其它 6 个簇中 (Cluster A、B、C、D、E 和 F) 均来自于环境样品中的克隆序列。Marston 等<sup>[24]</sup> 以 CPS1/CPS2、CPS1/CPS4 及 CPS1/CPS8 三对引物对罗德岛海域分离获得的 36 个噬藻体菌株进行 PCR 扩增, 系统发生分析表明有 35 个噬藻体分布在 Cluster I、II 和 III 中。Short 和 Suttle 等<sup>[25]</sup> 以 CPS4/G20-2 引物比较海洋水体和淡水噬藻体 *g20* 基因多样性时发现, 所有分离到的蓝藻病毒与 22 个环境克隆 (包括来源于湖泊淡水和海水) 聚为一类, 称为 CSP (Cultured

*Synechococcus* Phage) 类群, 其它的环境克隆分布在多个进化分支上。Sullivan 等<sup>[26]</sup> 以 CPS1.1/CPS8.1 为引物, 对分离的 38 株海洋噬藻体菌株的 *g20* 基因进行研究, 发现这些菌株均归为 CSP 类群。我国研究者闫群等<sup>[27]</sup> 以 CPS1/CPS4 引物, 采用 PCR-RFLP 方法调查了青岛近海海域噬藻体 *g20* 基因型的分布情况, 发现所得序列可分为两部分, 一部分与其它海洋生态系统一样都分布在 Cluster III 中, 而另一部分是青岛近海中首次发现的新的噬藻体簇 (Cluster W)。以上研究表明, 在不同海洋环境中都存在着独特的噬藻体类群。

同一地点不同采样时期的噬藻体 *g20* 基因组存在动态变化。Marston 等<sup>[24]</sup> 对罗德岛海域水体中噬藻体分布进行 3 年的监测, 发现夏季 *g20* 基因多样性比冬季要多一些。对挪威海岸水体中的蓝藻病毒群落采用 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳) 研究发现, 蓝藻病毒在春夏两季为一类群, 而到秋季为另一类群<sup>[29]</sup>。噬藻体在环境中的丰度种类的变化与其宿主蓝藻体的多样性紧密相关。Wang 等<sup>[28]</sup> 以 CPS1/CPS8 引物, 运用 PCR-T-RFLP (T 末端限制片段长度多态性) 对美国切萨皮克海湾 (Chesapeake Bay) 中噬藻体病毒基因多样性研究发现, 该水域噬藻体季节性变化较空间性 (深度) 变化明显, 季节性变化与寄主细胞数量呈现更大相关性。Sandaa 等<sup>[29]</sup> 以 CPS1/CPS2 为引物, 采用流式细胞仪和实时定量 PCR 对挪威海岸水体中聚球藻和噬藻体多样性研究发现, 两者之间全年共变化, 在秋季数量达到最大。Mühling 等<sup>[30]</sup> 以 CPS4/CPS5 引物, 对亚喀巴 (Aqaba) 海峡中聚球藻 (*ropC1* 基因为分子标记) 和噬藻体丰度和多样性研究也发现, 噬藻体 *g20* 基因型和与聚球藻基因型存在着共变化现象, 说明噬藻体在控制与其共存的聚球藻菌群的丰度和多样性方面起重要作用。此外, Jameson 等<sup>[31]</sup> 对从大西洋南北 8 个样点 10 个样品获得的 630 个噬藻体 *g20* 基因克隆子, 与已发表的 786 个 *g20* 基因序列构建的系统进化树分析发现, 噬藻体多样性与原绿球藻和聚球藻的多样性具有相关性。

有关噬藻体群落结构对环境因子响应研究结果不尽一致。Frederickson 等<sup>[32]</sup> 以 CPS4/CPS5 为引物, 利用 PCR-DGGE 技术对加拿大不列颠哥伦比亚海湾不同深度的噬藻体研究发现, 温度和盐度不同的水柱中噬藻体的群落结构不同, 不同采样点和采

样深度中噬藻体群落结构也存在着差异,这意味着海洋水体中噬藻体菌群在空间上存在差异,可能与其生境中寄主菌群分布有关。Jameson 等以 CPS1.1/CPS8.1 引物研究发现噬藻体和其环境因子(如总氮、亚硝态氮、硝态氮、磷酸盐、溶解氧、温度、深度)无相关性<sup>[31]</sup>,但大量研究发现在海洋生态系统中在各个采样点均存在各自特有的类群,如美国切萨皮克海湾大部分 g20 基因型与开放性海洋水体中的 g20 基因型不同<sup>[28]</sup>,在河口与开放性海洋环境中噬藻体群落结构与组成均有独特的类群<sup>[5]</sup>。

### 3.2 湖泊中噬藻体 g20 基因多样性

蓝藻也是湖泊生态系统的重要组成部分。与海洋环境相比,对淡水湖泊中 g20 基因多样性研究相对较少,主要集中在加拿大的卡尔图斯湖(Lake Cultus)、智利域湖(Lake Chilliwack)、德国的康士坦茨湖(Lake Constance)、法国的泊布尔热湖(Lake Bourget)等湖泊中。Dorigo<sup>[33]</sup>以 CPS1/CPS8 为引物,采用克隆及 PCR-DGGE 技术从法国最大的自然湖-泊布尔热湖得到 47 条噬藻体 g20 序列,划归为 35 种不同的噬藻体基因型,这些基因进一步归为 7 个遗传上不同的可操作分类单元(OTUs),系统发育分析发现一些 OTUs 与来源于海洋的序列关系近,而另一些 OTUs 为淡水湖泊所特有。基于一些淡水湖泊中 g20 基因与海洋环境亲缘关系近的事实,他们认为一些海洋噬藻体与淡水噬藻体可能存在着共同的起源。Wilhelm 等<sup>[34]</sup>以 CPS1/CPS8 引物,对伊利湖噬藻体基因多样性研究发现,该湖中广泛分布着侵染海洋聚球藻 WH7803 的噬藻体,对分离获得的噬藻体 g20 基因、湖泊水及商业船压舱水的扩增产物分析发现,这些 g20 基因均与海洋噬藻体相关,经系统发生分析也可形成一个独特的分枝,从而使人们认为淡水系统中噬藻体可能和海洋系统中同样重要。

Short 和 Suttle 等<sup>[25]</sup>采用引物 CPS4/G20-2 比较了海洋和淡水中噬藻体群落结构,构建的系统发育树发现了 4 个新的类群,其中 2 个类群(Group J 和 GroupG)完全来自于淡水水体,另外 2 个类群(Group H 和 GroupK)则包括淡水和海洋中的序列。来自不同环境中的 54 条序列中有 22 条分布在前面提到的 CSP 群中,而对于 CSP 群外的一些 g20 序列,他们认为其来源可能不是噬藻体。原因在于 3 条从大于 3000 m 深极地海洋水中获得的 g20 基因

序列没有分布在 CSP 群中,而在此环境中蓝藻的丰度很低( $< 10^2$  /mL),所以推测这些 g20 序列有可能来自于其它种类噬菌体,或者是 g20 基因在其它噬菌体和噬藻体间可以水平转移。但是,到目前为止,尚未从分离得到的非噬藻体噬菌体中采用 CPS1/CPS8 扩增得到 g20 基因序列的报道。以 g20 为遗传标记在海洋水体的研究中发现其寄主和浮游病毒的基因多样性呈现正相关<sup>[30]</sup>,水体中病毒和其宿主的丰度也呈现正相关<sup>[2]</sup>,但是在淡水生态系统中,尽管发现丝状蓝藻 *Planktothrix rubescens* 的数量在水体中相对较高,但病毒菌群与其并未呈现明显的关系<sup>[33]</sup>。可能存在着丝状蓝藻对噬藻体的抗性或/且所获得的 g20 基因序列仅属于单细胞蓝藻病毒。Baker 等<sup>[35]</sup>采用引物对 CPS1/CPS2 和 CPS1/CPS8 对分离自淡水丝状蓝藻噬藻肌尾病毒 AN-15、A-1 和 N-1 进行 PCR 扩增,但未能得到 PCR 产物,表明侵染淡水环境丝状蓝藻的噬藻体可能不同于侵染单细胞蓝藻的海洋噬藻体。此外,淡水湖泊中噬藻体丰度的监测也取得了突破性进展,Matteson 等<sup>[36]</sup>利用 CPS1/CPS2 引物,采用定量 PCR 方法对北美五大淡水湖中噬藻体丰度监测发现,该系统中噬藻体丰度可达到  $3.1 \times 10^6$  g20 基因拷贝/mL,且夏季病毒的总丰度高于冬季。

### 3.3 稻田中噬藻体 g20 基因多样性

虽然稻田中生存着多种蓝藻,蓝藻在维持稻田土壤肥力和稻田生态系统物种多样性上起到重要作用,但针对稻田生态系统蓝藻病毒基因多样性研究很少。王光华等<sup>[37]</sup>采用与海洋和湖泊研究相同的方法,以 CPS1/CPS8 为引物从日本一个稻田田面水中扩增出 77 条不同核苷酸的 g20 基因序列。系统发育分析表明,这些基因序列与已报道的噬藻体分离株和来自海洋和湖泊水体中 g20 克隆聚类为 5 个主要的进化簇(Cluster  $\alpha$ -Cluster  $\epsilon$ )。Cluster  $\alpha$  包括稻田田面水在内从淡水环境下获得的 g20 基因,稻田田面水中获得的 65% 克隆分布在 Cluster  $\alpha$  中,且形成 4 个独立的分支,被定名为 PFW-I-PFW-IV。Cluster  $\beta$  和  $\gamma$  有来自稻田、海洋和湖泊的 g20 克隆组成。来自稻田田面水的部分克隆在该两簇中也分别形成 2 个独立的分支,定名为 PFW-V 和 PFW-VI。Cluster  $\delta$ ,亦即前面提到的 CSP 类群,包含所有分离得到的海洋噬藻体和 9 个来自稻田田面水克隆,且这 9 个克隆在 Cluster  $\delta$  中形成 2 个独立的

subcluster, 被定名为 CSP-FPW1 和 CSP-FPW2。鉴于 CSP 类群中的噬藻体主要是由侵染 *Synechococcus* 病毒组成, 而稻田田面水中在该类群中形成独立的分支, 表明其宿主在稻田田面水中也存在与海洋环境中不同的 *Synechococcus* 菌群。总体而言, 稻田田面水中绝大多数 *g20* 克隆形成的几个特立的进化分支, 这些分支与淡水环境中 *g20* 序列亲缘关系近, 而与海洋环境中 *g20* 序列远。

蓝藻不仅生存于稻田水体中, 也存在于稻田土壤中<sup>[38]</sup>。2011年, 王光华等<sup>[39]</sup>进一步报道了 *g20* 基因在稻田土壤中的分布情况。研究者从3个地点2个采样时期稻田土壤中获得69个 *g20* 基因。对获得的基因序列与已报道的序列构建的系统进化树分析发现, 稻田土壤中的 *g20* 克隆主要分布在

Cluster  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\epsilon$  中, 在 Cluster  $\beta$  和  $\epsilon$  中分别形成了3个和1个新独立的进化分支, 被定名为 PFS-I、PFS-II、PFS-III 和 PFS-IV。来自稻田田面水中的 *g20* 克隆主要分布在 Cluster  $\alpha$  中, 而来自稻田土壤中的克隆主要分布在 Cluster  $\beta$  中。稻田土壤中没有克隆属于 CSP 类群。采用 UniFrac 软件进一步分析发现, 以 *g20* 基因序列表征的噬藻体群落结构在稻田土壤和稻田田面水之间差异明显。且不同采样地点和同一地点不同采样时间 *g20* 基因群集差异明显, 表明稻田土壤中噬藻体群落结构存在时间和空间上的变化。图1显示了噬藻体 *g20* 基因在稻田土壤、稻田田面水、淡水和海洋水体中的分布情况, 表明不同自然环境中噬藻体 *g20* 基因组成存在一定的差异。

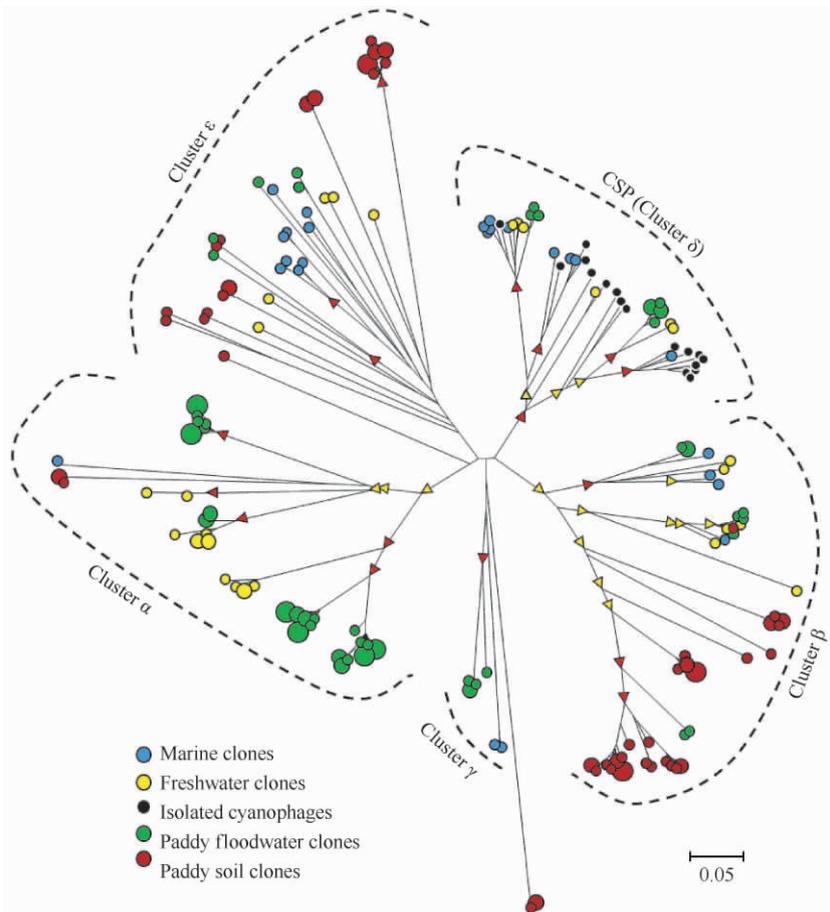


图1. 稻田土壤、稻田田面水与海洋及其它淡水环境中噬藻体 *g20* 基因编码氨基酸序列构建的系统发育树

Figure 1. Unrooted phylogenetic tree comparing *g20* amino acid sequences from environments of paddy soils, paddy floodwaters, marine waters and freshwaters, as well as from isolated cyanophages of marine *Synechococcus* and *prochlorococcus*. The red and yellow triangles indicate internal nodes with at least 90% and 50% bootstrap supports, respectively. The size of circles at the end of branches is proportional to the number of clones/phages, and the smallest, moderate and the largest circles represent one, two and four clones/phages, respectively.

## 4 研究展望

到目前为止,利用 *g20* 基因已成功地对湖泊<sup>[25,33]</sup>、河口<sup>[5]</sup>、池塘<sup>[25]</sup>、稻田<sup>[37,39]</sup>、海湾<sup>[26]</sup>、近海海域<sup>[27,29]</sup>、开阔海域<sup>[31]</sup>及寡营养海域<sup>[5]</sup>中噬藻体基因多样性进行了研究。大量研究发现,不同水域间噬藻体 *g20* 基因多样性存在着一定差异,各自都有独特的类群,这表明 *g20* 基因的分布与其存在的环境有一定的关系。但上述研究均是基于对环境 eDNA 样品的解析,对于噬藻体与其宿主蓝藻之间的对应关系还有许多不明之处。故此,采用传统分离纯化方法结合分子生物学技术解析蓝藻和噬藻体基因之间关系仍是值得深入研究的方向,尤其是淡水环境中丝状蓝藻及噬藻体基因多样性关系可能更为复杂。

尽管引物 CPS1/CPS8 是被用来研究噬藻体 *g20* 基因最多的引物,但该对引物从环境样品中扩增得到的 *g20* 基因是否全部来源于噬藻体是一个值得探讨的问题。表 1 中引物均是基于分离自单细胞蓝藻 *Synechococcus* 和 *Prochlorococcus* 的噬藻体基因序列而设计出来的。尽管 Deng 和 Hayes<sup>[40]</sup> 采用 CPS1/CPS2 引物对成功地扩增出丝状蓝藻 *Planktothrix rubescens* 病毒 P-Z1 的 *g20* 基因,但他们未尝试采用 CPS1/CPS8 引物也可以获得 *g20* 基因。同样 Baker 等<sup>[35]</sup> 采用引物 CPS1/CPS2 和 CPS1/CPS8 对 3 种分离自丝状蓝藻的病毒进行 PCR 扩增也未得到产物。最近, Lee 等<sup>[41]</sup> 采用 DNA-SIP (DNA 稳定性同位示踪) 技术研究发现,具有 *g20* 基因的噬菌体可能不是来源于噬藻体,或噬藻体也可侵染除蓝藻外的其它细菌。这种推测是否正确,尚需通过采用 CPS1/CPS8 扩增除噬藻体外的其它病毒予以直接证明。但到目前为止,基于现有的数据和手段,尚未有采用引物 CPS1/CPS8 从其它噬菌体中获得相应 *g20* 序列的报道,故认为该引物获得的 *g20* 基因源于噬藻体。

表 1 引物只能扩增出侵染蓝藻肌尾病毒科的噬菌体,但在自然环境中长尾病毒和短尾病毒科的噬藻体也常侵染蓝藻。对这些蓝藻病毒基因多样性的研究,一方面需要设计出覆盖面更广的引物,另一方

面也需要结合其它蓝藻病毒的分子标记物,如 *psbA* 基因、*psbD* 基因和 *pol* 基因等对蓝藻-噬藻体系统进行深入研究。此外,在过去的几十年,我国针对噬藻体的分离及生理特性开展了相关研究,关于噬藻体基因多样性的研究则刚刚起步,主要集中在青岛近海域<sup>[27]</sup>、太平洋<sup>[6]</sup>等,且这些地区所采用的靶标基因不同。对于其他生态系统中,如盐碱湖泊、稻田土壤等,噬藻体基因多样性有待探讨。

从上述对不同自然环境中 *g20* 基因多样性研究进展可以看出,环境中的噬藻体基因组成复杂多样,而我国对噬藻体基因多样性研究刚刚起步,随着对不同生态环境下噬藻体基因多样性及其与环境之间的关系不断明晰,以及噬藻体其它结构和功能基因逐渐明晰,对于明确噬藻体在控制蓝藻群落结构的变化、及生物地球化学循环和生物进化中的作用具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399 (6736): 541-548.
- [2] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64 (1): 69-114.
- [3] Kimura M, Jia ZJ, Nakayama N, Asakawa S. Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54 (1): 1-32.
- [4] Wilhelm SW, Suttle CA. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience*, 1999, 49 (10): 781-788.
- [5] Zhong Y, Chen F, Wilhelm SW, Poorvin L, Hodson RE. Phylogenetic Diversity of Marine Cyanophage Isolates and Natural Virus Communities as Revealed by Sequences of Viral Capsid Assembly Protein Gene *g20*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4): 1576-1584.
- [6] Huang SJ, Wilhelm SW, Jiao NZ, Chen F. Ubiquitous cyanobacterial podoviruses in the global oceans unveiled through viral DNA polymerase gene sequences. *ISME Journal*, 2010, 4 (10): 1243-1251.
- [7] Chénard C, Suttle CA. Phylogenetic Diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene *psbA* in marine and freshwaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (17): 5317-5324.

- [8] Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch HM. Marine T4 type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proceeding National Academy of Sciences of United States of American*, 2005, 102 (35): 12471–12476.
- [9] Wang G, Liu J, Makoto Kimuria. Genetic diversity of major capsid genes (g23) of T4-type bacteriophages in natural environments—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (6): 732–739. (in Chinese).  
王光华, 刘俊杰, Makoto Kimuria. 自然环境中 T4 型噬藻体 g23 基因多样性的研究进展. *微生物学报*, 2011, 51 (6): 732–739.
- [10] Liu HB, Nolla HA, Campbell L. *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997, 12 (1): 39–47.
- [11] Zehr JP, McReynolds LA. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmiumthiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55 (10): 2522–2526.
- [12] Prasanna R, Sharma E, Sharma P, Kumar A, Kumar R, Gupta V, Pal RK, Shivay YS, Nain L. Soil fertility and establishment potential of inoculated cyanobacteria in rice crop grown under non-flooded conditions. *Paddy and Water Environment*, 2013, 11 (1–4): 175–183.
- [13] Lan SB, Wu L, Zhang DL, Hu CX. Composition of photosynthetic organisms and diurnal changes of photosynthetic efficiency in algae and moss crusts. *Plant and Soil*, 2012, 351 (1–2): 325–336.
- [14] Waterbury JB, Watson SW, Valois FW, Franks DG. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1986, 214: 71–120.
- [15] Canter-Lund H, Lund JWG. *Freshwater algae: their microscopic world explored*. Biopress Ltd, Bristol, England: 1995, 194–237.
- [16] Safferman RS, Morris ME. Algal virus: isolation. *Science*, 1963, 140 (356): 679–680.
- [17] Hu NT, Thiel T, Giddings TH, Wolk CP. Anabaena and Nostoc cyanophages from sewage settling ponds. *Virology*, 1981, 114 (1): 236–246.
- [18] Adolph KW, Haselkorn R. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga *Nostocmuscorum*. *Virology*, 1971, 46 (2): 200–208.
- [19] McDaniel L, Houchin LA, Williamson SJ, Paul JH. Lysogeny in marine *Synechococcus*. *Nature*, 2002, 415 (6871): 496.
- [20] Safferman RS, Cannon RE, Desjardins PR, Gromov BV, Haselkorn R, Sherman LA, Shilo M. Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. *Intervirology*, 1983, 19 (2): 61–66.
- [21] Gao EB, Gui JF, Zhang QY. A novel cyanophage with a cyanobacterial nonbleaching protein A gene in the genome. *Journal of Virology*, 2012, 86 (1): 236–245.
- [22] Zhang Q, Gui J. A kind of strategic bio-resource not to be neglected—freshwater and marine viruses and their roles in the global ecosystem. *Bulletin of Chinese Academy of Science*, 2009, 24 (4): 414–420. (in Chinese).  
张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源——淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用. *中国科学院院刊*, 2009, 24 (4): 414–420.
- [23] Fuller NJ, Wilson WH, Joint IR, Mann NH. Occurrence of a Sequence in Marine Cyanophages Similar to That of T4 g20 and Its Application to PCR-Based Detection and Quantification Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (8): 2501–2060.
- [24] Marston MF, Sallee JL. Genetic Diversity and Temporal Variation in the Cyanophage Community Infecting Marine *Synechococcus* Species in Rhode Island's Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (8): 4639–4647.
- [25] Short CM, Suttle CA. Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (1): 480–486.
- [26] Sullivan MB, Coleman ML, Quinlivan V, Rosenkrantz JE, Defrancesco AS, Tan G, Fu R, Lee JA, Waterbury JB, Bielawski JP, Chisholm SW. Portal protein diversity and phage ecology. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (10): 2810–2823.
- [27] Yan Q, Wang M, Bai X, Sun J, Liang Y, Wang F, Yang L, Liu G, Lu L. New phylogenetically distinct

- cyanophages found in the coastal Yellow Sea by Qingdao. *Acta Virologica*, 2010, 54 (4) : 255-260.
- [28] Wang K, Chen F. Genetic diversity and population dynamics of cyanophage communities in the Chesapeake Bay. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, 34 (2) : 105-116.
- [29] Sandaa RA, Larsen A. Seasonal variations in virus-host populations in Norwegian coastal waters: focusing on the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (7) : 4610-4618.
- [30] Mühling M, Fuller NJ, Millard A, Somerfield PJ, Marie D, Wilson WH, Scanlan DJ, Post AF, Joint I, Mann NH. Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (4) : 499-508.
- [31] Jameson E, Mann NH, Joint I, Sambles C, Muehling M. The diversity of cyanomyovirus populations along a North-South Atlantic Ocean transect. *ISME Journal*, 2011, 5 (11) : 1713-1721.
- [32] Frederickson CM, Short SM, Suttle CA. The physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microbial Ecology*, 2003, 46 (3) : 348-357.
- [33] Dorigo U, Jacquet S, Humbert JF. Cyanophage Diversity, Inferred from *g20* Gene Analyses, in the Largest Natural Lake in France, Lake Bourget. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (2) : 1017-1022.
- [34] Wilhelm SW, Carberry MJ, Eldridge ML, Poorvin L, Saxton MA, Doblin MA. Marine and freshwater cyanophages in a Laurentian Great Lake: evidence from infectivity assays and molecular analyses of *g20* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (7) : 4957-4963.
- [35] Baker AC, Goddard VJ, Davy J, Schroeder DC, Adams DG, Wilson WH. Identification of a diagnostic marker to detect freshwater cyanophages of filamentous cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (9) : 5713-5719.
- [36] Matteson AR, Loar SN, Bourbonniere RA, Wilhelm SW. Molecular enumeration of a cyanophage in a Laurentian Great Lake: quantitative evidence for ecological importance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (21) : 7730-7739.
- [37] Wang G, Murase J, Asakawa S, Kimura M. Unique viral capsid assembly protein gene (*g20*) of cyanophages in the floodwater of a Japanese paddy field. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46 (2) : 93-102.
- [38] Song TY, Martensson L, Eriksson T, Zheng WW, Rasmussen U. Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54 (1) : 131-140.
- [39] Wang G, Asakawa S, Kimura M. Spatial and temporal changes of cyanophage communities in paddy field soils as revealed by the capsid assembly protein gene *g20*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76 (2) : 352-359.
- [40] Deng L and Hayes PK. Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 2008, 53 (6) : 1240-1252.
- [41] Lee CG, Watanabe T, Fujita Y, Asakawa S, Kimura M. Heterotrophic growth of cyanobacteria and phage-mediated microbial loop in soil: Examination by stable isotope probing (SIP) method. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2012, 58 (2) : 161-168.

# Genetic diversity of capsid assembly protein genes (*g20*) of cyanophage in different natural environment—A review

Ruiyong Jing<sup>1,2,3</sup>, Makoto Kimura<sup>4</sup>, Guanghua Wang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Science, Harbin 150081, China

<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> Heilongjiang Bayi Agricultural University, College of Life and Sci-technology, Daqing 163319, China

<sup>4</sup> Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

**Abstract:** With the development of molecular biological techniques and progress of sequencing virus genome, scientists pay great attentions to the genetic diversity of viruses, which are ubiquitous and abundant in natural environments. So far, no universal genetic marker, analogous to 16S rDNA and 18S rDNA used for microbial communities exists throughout all viruses. However, some family-specific genes encoding conserved amino acids have been proposed for the evaluation of phage diversity and a series of breakthrough achievements were obtained. In this paper, we targeted the capsid assembly protein genes (*g20*) of cyanophages and reviewed the recent progress on their genetic diversity in natural environments of marines, lakes and paddy fields and discussed the relationship between distribution of *g20* gene of cyanophages and its environments. Those studies showed that the distribution of *g20* gene varied with environments and many unique clusters were found in different natural environment. In final, several research issues and the future research tendencies for the study of environmental *g20* gene were also addressed in this paper.

**Keywords:** Cyanophage, *g20* gene, virus ecology, marine, lake, paddy field

(本文责编: 张晓丽)