



## 东北稻田水体噬藻体 *psbA* 基因多样性

荆瑞勇<sup>1,2</sup>, 曹焜<sup>1,2</sup>, 刘俊杰<sup>1</sup>, 刘居东<sup>1</sup>, 金剑<sup>1</sup>, 刘晓冰<sup>1</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, 黑龙江 哈尔滨 150081

<sup>2</sup> 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

**摘要:**【目的】揭示东北稻田噬藻体 *psbA* 基因多样性, 分析其系统进化地位, 为噬藻体生态学研究提供数据支持。【方法】采用滤膜分离并浓缩噬体、PCR-克隆测序技术对我国东北稻田水体中噬藻体 *psbA* 基因进行调查。【结果】在东北稻田水体中共得到 17 条来自于噬藻体的 *psbA* 基因, 经系统进化分析表明, 我国东北稻田具有新的噬藻体的类群, 与日本稻田生态系统中 *psbA* 基因类群相比, 两地间噬藻体类群存在显著的差异, 稻田水体中噬藻体 *psbA* 基因类群有别于海洋、湖泊类群。【结论】采用 PCR-克隆测序技术以 *psbA* 基因为分子标记首次对我国东北稻田水体噬藻体类群进行调查, 发现有新的噬藻体类群。

**关键词:** 噬藻体, *psbA* 基因, 稻田水体

噬藻体是侵染蓝藻的细菌病毒, 广泛分布于地球生物圈的生命体<sup>[1]</sup>。细菌病毒作为遗传物质的交换载体<sup>[2]</sup>, 在病毒侵染过程中引起原核生物的遗传变异, 影响着原核生物的群落结构<sup>[3]</sup>, 在水体食物网结构与功能起关键作用<sup>[4]</sup>, 被认为是生态功能和物种进化的驱动力<sup>[5-6]</sup>。

*psbA* 是编码光合系统 II 反应中心蛋白 D1 亚基的基因, 可作为水体中光合微生物类群很好的分子标记<sup>[7]</sup>。很多噬藻体中也含有 *psbA* 基因<sup>[8-9]</sup>。研究发现在供试的 33 株噬藻体中 *psbA* 基因只在肌尾病毒和原绿球藻短尾病毒中发现, 而原绿球

藻长尾病毒和聚球藻短尾病毒未发现 *psbA* 基因, 可能与噬藻体的宿主范围及噬藻体间水平或垂直基因转移有关<sup>[10]</sup>。在自然海洋水体宏基因组数据显示, 海洋表层水中约 60% 的 *psbA* 基因来源于噬藻体源<sup>[11]</sup>。噬藻体含有 *psbA* 基因是使病毒在侵染宿主过程中保护宿主的光合营养功能, 免受光抑制, 为病毒在宿主体内复制提供能量的适应性表现<sup>[12-14]</sup>, *psbA* 基因通过在噬藻体介导下于聚球藻和原绿球藻间穿梭, 达到噬藻体和蓝藻的共进化<sup>[15]</sup>。

稻田是一类典型的人工湿地环境, 蓝藻是生态环境中主要的成员, 参与水体的碳氮物质循环。

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: wanggh@iga.ac.cn

收稿日期: 2016-05-21; 修回日期: 2016-07-04; 网络出版日期: 2016-09-07

*psbA* 基因作为分子标记在湖泊、海洋生态系统中研究较多<sup>[16-17]</sup>,而在稻田生态系统的分布鲜有报道。王光华等<sup>[18]</sup>曾首次利用 *psbA* 基因对日本稻田生态系统中噬藻体多样性进行研究,发现与海洋水体相比,稻田水体中的 *psbA* 基因序列更接近于淡水水体。本研究主要目的主要探索中国东北稻田水体中 *psbA* 基因多样性的组成,同时比较中国东北稻田水体与日本稻田水体 *psbA* 基因多样性的差别。为此,本文采用 PCR-克隆测序的方法对东北不同类型稻田水体中 *psbA* 基因多样性进行调查,为病毒资源的调查提供数据支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 稻田水样的采集

本试验于 2013 年 7 月 14 日至 7 月 18 日在中国东北 3 种不同类型稻田采集稻田水体。这是 3 块稻田包括黑龙江省建三江(47°14' N, 132°33' E)、阎家岗(45°35' N, 126°20' E)、吉林省大安(45°36' N, 123°50' E)。水稻插秧于 2013 年 5 月 20 日至 6 月 10 日期间,其他与当地农艺措施相同。稻田水体采集及稻田水样预处理的方法同参考文献[19]。

### 1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

水样中的病毒 DNA 提取方法见参考文献[19],但在用 DNA 酶和 RNA 酶(各 40 μg/mL, 宝泰克) 37 °C 处理时 5 h 改为 7 h。*psbA* 基因由引物 *psbA*-F (5'-GTNGAYATHGAYGGNATHMGNGARCC-3')和 *psbA*-R (5'-GGRAARTTRTGNGCRTTNC KYTCRTGC-3')进行 PCR 扩增<sup>[7]</sup>。PCR 扩增体系为 50 μL,其中包含 0.5 μL 上游和下游引物(50 pmol), 1-2 μL DNA 模板, 5 μL dNTPs (2.5 mmol/L TaKaRa, 大连), 5 μL *rTaq* 缓冲液(TaKaRa, 大连),

1 μL *rTaq* 酶合酶(5 U/μL, TaKaRa, 大连),加入无菌去离子水至要求的体积。阴性对照无菌 ddH<sub>2</sub>O 为模板。PCR 扩增条件为 94 °C 5 min ;92 °C 1 min ;57 °C 1 min ;68 °C 1 min ;35 个循环 ;72 °C 10 min。

### 1.3 克隆与测序

从 1.5%凝胶上切取约 850 bp 大小的 PCR 产物,用 QIAquick 胶回收试剂盒进行胶纯化,目的 DNA 片段连接至 pMD18-T 质粒(TaKaRa, 大连),转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。大约每个转化平板中选出 50 个白色克隆,再用 *psbA*-F/*psbA*-R 引物进行菌体 PCR 扩增,循环数降至 26。选阳性克隆的培养过夜菌液,递交测序公司(华大基因,深圳)测序。

### 1.4 系统进化分析

克隆的核苷酸序列采用欧洲生物信息研究所网站(<http://www.ebi.ac.uk/>)EMBOSS Transeq 程序翻译成推导的氨基酸序列。*psbA* 阳性克隆最近的亲缘序列经 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上在氨基酸水平 BLAST 比对获得。本文获得的 *psbA* 基因序列亲缘关系分析,首先与日本稻田土壤和水体中获得的噬藻体源的 *psbA* 序列分析,然后再与已发表的分离噬藻体 *psbA* 基因序列和环境克隆序列,以及非噬藻体的 *psbA* 基因序列进行分析。为了评估中国东北稻田水体中 *psbA* 集合体与日本稻田水体 *psbA* 集合体是否相同,采用 UniFrac (<http://bmf.colorado.edu/unifrac/>)分析方法进行不加权(Unweighted) *P* 值检测。

### 1.5 提交序列

本研究的序列已提交至 NCBI 网站,其序列号为: KX443367-KX443383。

## 2 结果和分析

### 2.1 稻田水体病毒 DNA 提取、PCR 扩增、胶回收及克隆筛选

稻田水体过 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜后,将病毒收集到 0.03  $\mu\text{m}$  滤膜上,提取 DNA(图 1-A)后,PCR 扩增 *psbA* 基因于 850 bp 位置有明显亮带(图 1-B),经胶回收获取 850 bp 目的基因(图 1-C),每个样品的克隆筛选阳性克隆的位置也在 850 bp 的位置(图 1-D),将阳性克隆送测序公司测序,获得 17 条不同的 *psbA* 基因,其中 12、4、1 个阳性克隆分别来自于阎家岗、大安和建三江稻田水体。扩增出的 *psbA* 基因长度是相同的,均为 795 bp (不含

引物部分长度),可翻译成 264 个氨基酸残基。

### 2.2 *psbA* 基因的最近亲缘序列分析

如表 1 所示,在 NCBI 网站上,基于氨基酸水平的 BLAST 比对结果显示,本研究中获得 13 条 *psbA* 基因与日本稻田克隆具有最高的相似性,相似率在 94%–99% 之间;有 3 条 *psbA* 基因与罗德岛海岸水体中噬藻体 S-SIM17 具有最高的相似性,相似率在 97%–99% 之间;仅有 1 个克隆与中国东海的 *psbA* 克隆 PN04-004 具有最高的相似性(96%)。本研究中也获得了一些非噬藻体源的 *psbA* 基因序列,但经 BLAST 比对后,这些序列已被剔除,未进行分析。

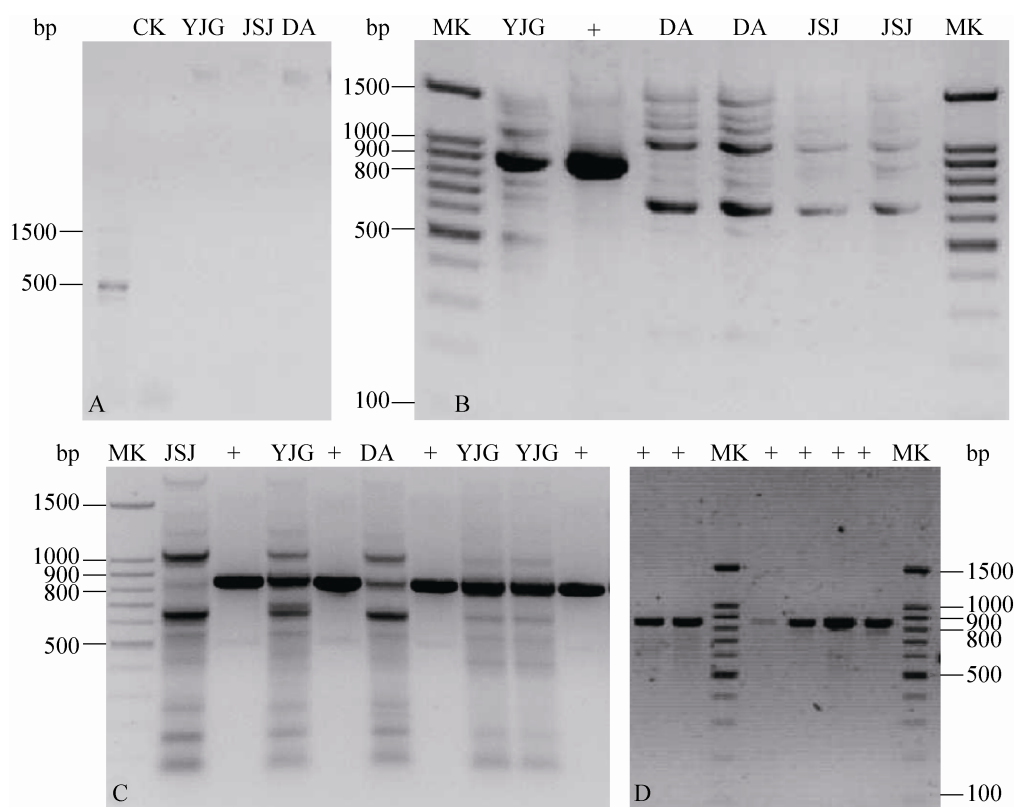


图 1. 东北稻田水样中病毒 DNA 提取(A)、*psbA* 基因的 PCR 扩增(B)、胶纯化(C)及阳性克隆检测(D)  
Figure 1. Profiles of viral DNA extraction, PCR amplification, gel purification and positive clone of *psbA* gene from cyanophage in paddy floodwater in Northeast China. MK, +, CK, YJG, JSJ, SH, DA indicate DNA marker, positive clone, control, Yanjiagang (阎家岗), Jiansanjiang (建三江), and Daan (大安) samples, respectively.

表 1. 东北稻田水体 *psbA* 基因与 NCBI 数据库在氨基酸水平的同源性比较Table 1. Closest relatives of sequenced *psbA* clones from different paddy floodwater at the amino acid level

Clone name	Closest relative	Accession No.	Identities/%	Alignment	Remark
PFW-YJG-1	NoF10	BAH23190	99	261/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-2	S-RIM17	ACY42497	98	258/263	Marston and Amrich, 2009
PFW-YJG-3	CF(-N)1	BAH23191	98	247/251	Wang et al., 2009
PFW-YJG-4	NoF9	BAH23189	99	261/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-5	CF(-N)1	BAH23191	98	259/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-6	S-RIM17	ACY42497	99	260/263	Marston and Amrich, 2009
PFW-YJG-7	CF(-N)1	BAH23191	98	260/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-8	NoF10	BAH23190	98	260/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-9	CM10	BAH23217	97	257/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-10	S-RIM17	ACY42497	97	256/263	Marston and Amrich, 2009
PFW-YJG-11	CM10	BAH23217	97	256/264	Wang et al., 2009
PFW-YJG-12	NoF10	BAH23190	99	261/264	Wang et al., 2009
PFW-DA-1	PN04-004	AGL79394	96	254/264	Zheng et al., 2014
PFW-DA-2	CF(-N)8	BAH23198	97	253/262	Wang et al., 2009
PFW-DA-3	NoF10	BAH23190	99	263/264	Wang et al., 2009
PFW-DA-4	NoF10	BAH23190	98	258/264	Wang et al., 2009
PFW-JSJ-1	CM6	BAH23213	94	247/263	Wang et al., 2009

YJG: Yanjiagang (阎家岗); JSJ: Jiansanjiang (建三江); DA: Daan (大安).

### 2.3 *psbA* 基因的系统进化分析

图 2 为本研究获得的 17 条 *psbA* 基因序列与从日本稻田水体中获得的噬藻体源 27 条 *psbA* 基因序列在氨基酸水平上构建的系统进化树。可将其划分为 5 个进化簇(Cluster I–Cluster V)，本研究获得的 *psbA* 序列分布在 Cluster I、III、IV 和 V 中，分别含有 6、2、5 和 3 条 *psbA* 序列。Sharon 等<sup>[11]</sup>利用 *psbA* 基因序列的 GC 含量及其氨基酸序列可变的三肽元件来区分 *psbA* 基因是否来自于噬藻体，他们认为 EQE、ENE、EEV、EEE、EDV、EVE、EQV 和 EDE 等几种病毒来更易来自于病毒 D1 亚基。Sullivan 等<sup>[10]</sup>发现，聚球藻噬藻体的 GC 含量为 46%–51%，而聚球藻宿主 GC 含量在 56%–62%。

在 Cluster I–Cluster V 进化簇中，*psbA* 基因序列的 GC 含量和三肽元件(XXX)<sup>R</sup>/<sub>K</sub>ETTXXXS<sup>Q</sup>/<sub>H</sub> 不同<sup>[11]</sup>。Cluster I 中 GC 含量为 45.8%–52.0% ( $x=48.7\pm 1.8\%$ )，主要含三肽元件是 EEV(PFW-YJG-12 为 EKV)；Cluster II 中 GC 含量为 47.2%–52.2% ( $x=51.1\pm 1.4\%$ )，主要含有三肽元件是 ESE(CF1 和 CM9 分别为 EVE 和 EAE)；Cluster III 中 GC 含量为 47.6%–47.7% ( $x=47.7\pm 0.1\%$ )，它包含序列中三肽元件是 ETE；Cluster IV 中 GC 含量为 45.2%–49.7% ( $x=47.5\pm 1.7\%$ )，它包含序列中三肽元件主要是 EVE 和 ENE(PFW-DA-1 的三肽元件是 ETE)；Cluster V 中 GC 含量为 46.9%–49.3% ( $x=48.3\pm 1.1\%$ )，它包含序列中三肽元件是 EEV。与 Cluster V 相近的有 1 条

*psbA* 序列 PFW-JSJ-1 它的三肽元件是 ETE, 其 GC 含量为 48.9%。三肽元件 ETE 在聚球藻菌株中也存在, 但聚球藻的肌尾病毒和短尾病毒也有 ETE, 结合该序列的系统进化位置, 作者推测 PFW-DA-1、PFW-YJG-9、PFW-YJG-11 和 PFW-

JSJ-1 的 *psbA* 基因来自于噬藻体。此外, 本研究中克隆 PFW-YJG-12 的三肽元件为 EKV, 经 GC 含量及系统进化地位分析(图 2 和图 3), 推测其来自于噬藻体。因此, 本研究获得的 17 条 *psbA* 基因均来自于噬藻体。

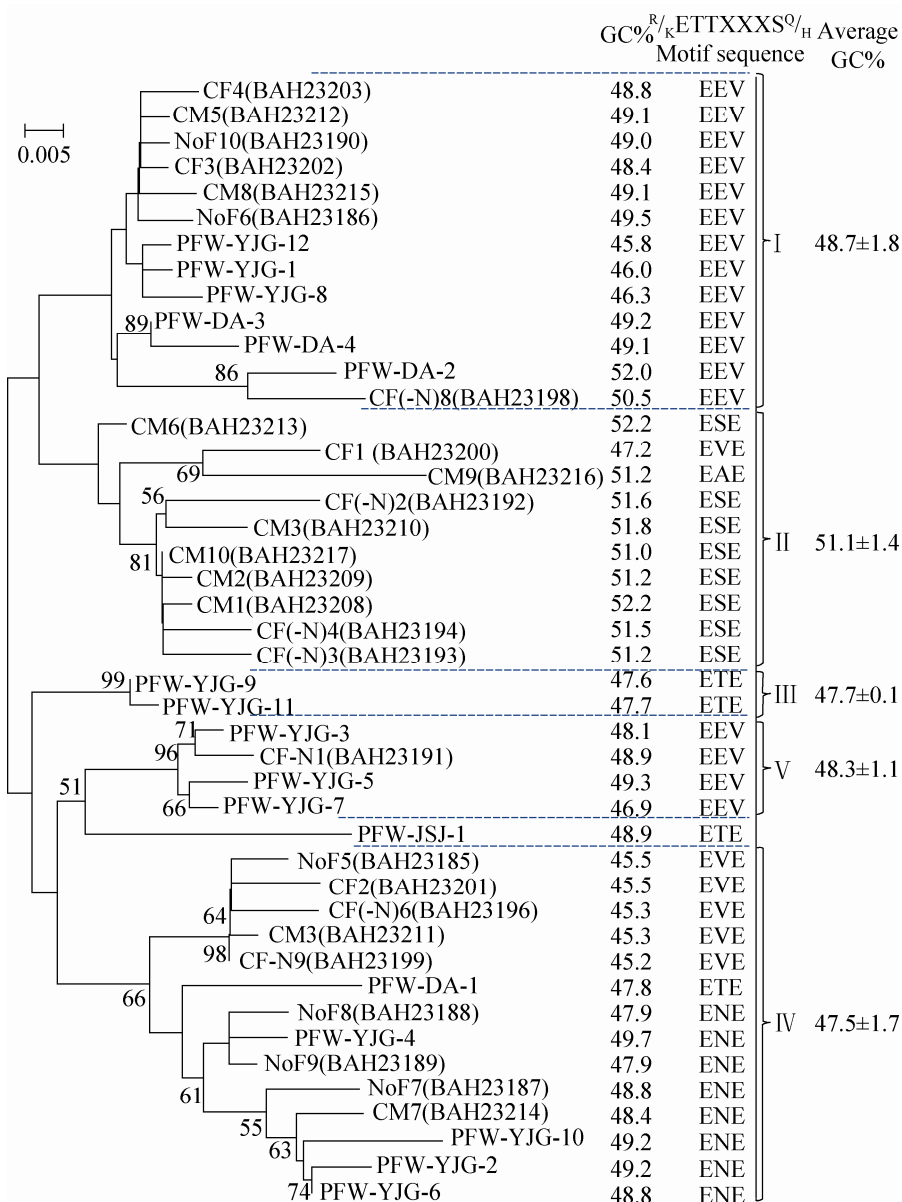


图 2. 中国东北稻田水体 *psbA* 序列与日本稻田水体 *psbA* 序列在氨基酸水平的系统进化树

Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationships of *psbA* amino acid sequence from paddy floodwater in NE China with those from in Japan.

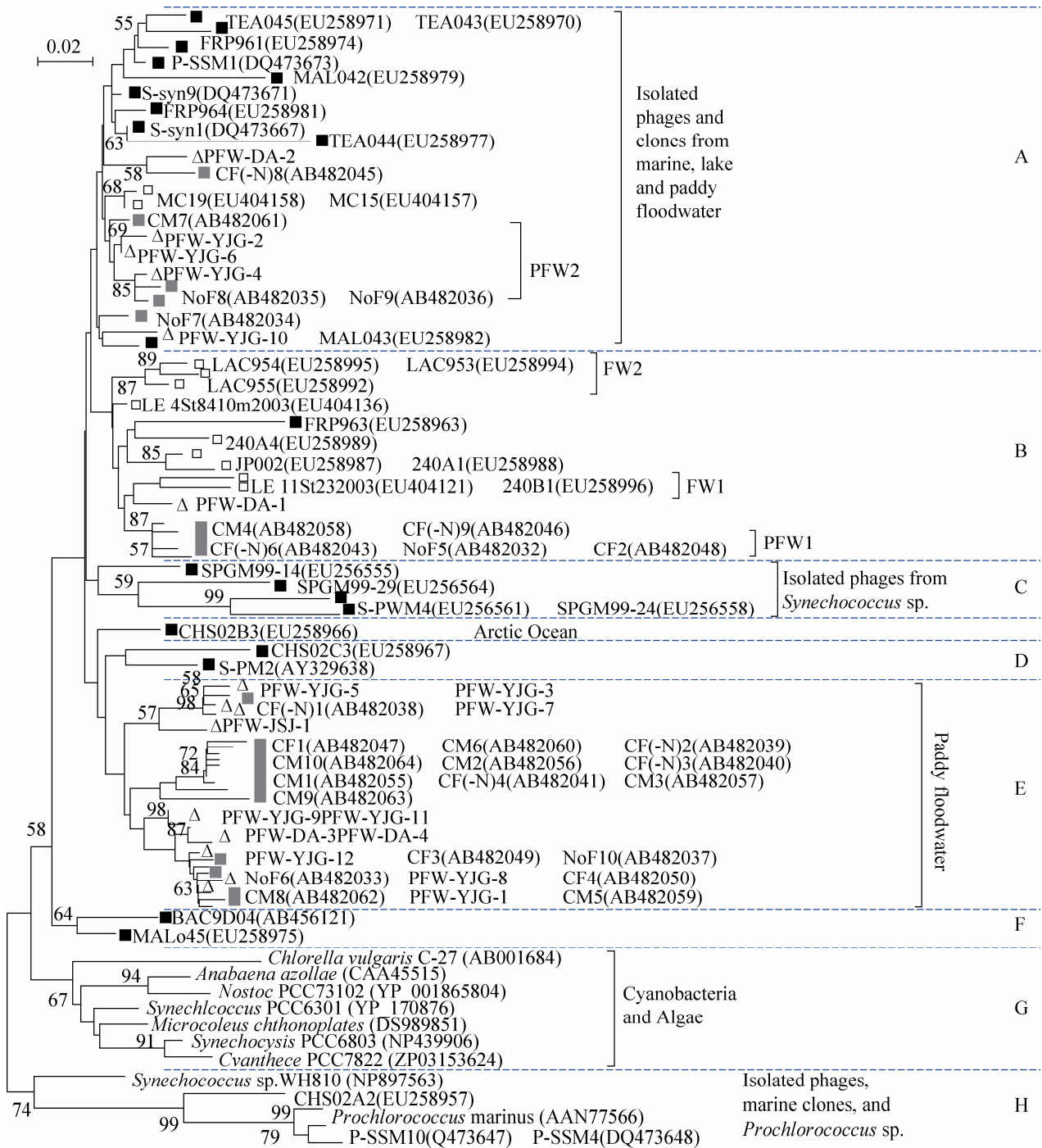


图 3. 我国东北稻田水体与日本稻田水体、及其他环境 *psbA* 序列构建的系统进化树

Figure 3. Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of *psbA* amino acid sequence from paddy floodwater in NE China and Japan and those from other environments. The blank triangle, gray box, black box and blank box indicate the *psbA* sequences of cyanophage from this study, paddy floodwater in Japan, marine and lake, respectively.

将本研究获得的 *psbA* 序列与具代表性的绿藻、蓝藻、噬藻体病毒株及环境中的噬藻体的 *psbA* 序列在氨基酸水平上构建系统进化树(图 3)。据系统进化树结构可将其划分为 8 个进化簇(Cluster A–Cluster H)。本研究获得的 17 条 *psbA* 序列主要分布在 Cluster A、B、E 中。Cluster C 主要来自聚球藻的噬藻体类群；Cluster D 和 F 主要来自于海洋的噬藻体分离株和克隆；Cluster G 和 H 包含有来自蓝藻、绿藻、海洋聚球藻(*Synechococcus*)、原绿球藻(*Prochlorococcus*)及其噬藻体分离株的 *psbA* 序列。

Cluster A 包含有来自于海洋、湖泊和稻田水体中 *psbA* 克隆，其中，大部分稻田水体 *psbA* 克隆与来自湖泊的克隆进化距离更相近些，而来自海洋水体的 *psbA* 的克隆形成一个相对独立的进化簇，在这个进化簇中，中国东北稻田与日本稻田水体中 *psbA* 基因可形成一个进化亚簇，王光华等<sup>[18]</sup>命名为 PFW-2；Cluster B 主要由来自稻田水体中的克隆和淡水湖泊中 *psbA* 克隆组成，其中 2 个来自淡水湖泊中进化亚簇，命名为 FW1 和 FW2<sup>[16]</sup>，1 个来自日本稻田水体的进化亚簇，王光华等<sup>[18]</sup>命名为 PFW1；Cluster E 中的克隆均来自稻田生态系统，其中本研究 11 条序列和日本稻田水体中 17 条序列分布在此进化簇中。在此进化簇中，由 PFW-YJG-9、PFW-YJG-11 和 PFW-DA-3、PFW-DA-4 形成 2 个进化亚簇主要来自中国东北稻田水体，日本稻田水体中也有特有的进化亚簇，此进化簇中两地域间的其他序列交叉分布。

采用不加权 UniFrac 分析表明，由本研究获得的 17 条 *psbA* 克隆序列集合体与日本稻田 27 条噬藻体源的 *psbA* 基因序列集合体差异显著 ( $P < 0.01$ )。表明两国之间稻田含有 *psbA* 基因的噬藻体群落不同。

### 3 讨论

本研究采用 *psbA* 基因的引物是简并性的，具有不同核苷酸序列的 *psbA* 片段在 DGGE 图谱中可能具有相同的位置，所以依据 DGGE 图谱对多个样品 *psbA* 基因多样性的比较是不可行的<sup>[18]</sup>。因此本研究采用 PCR 扩增后，对目的条带进行胶纯化，用纯化后的产物进行克隆测序的方法来调查我国东北稻田水体中噬藻体 *psbA* 基因多样性。

本研究发现，某些环境样品中 *psbA* 基因 PCR 扩增的目的条带有的并不是很亮，推测原因可能是：(1) 由于采集的水样中病毒含相对较少，而且采集的稻田水样为自然灌溉的地下水，稻田每隔 1 d 需要灌溉 1 次，对稻田水体中病毒浓度起到稀释作用；(2) 采集的水样量较小(500 mL)，扩大稻田水样的量，增加稻田病毒浓缩的倍数，可能会改善 PCR 扩增 *psbA* 基因的相对浓度。

环境样品中 *psbA* 基因如何与他们的宿主基因进行区别是最迷惑的问题。Chénard 和 Suttle<sup>[16]</sup>提出 3 种方法进行区分环境样品中病毒 *psbA* 基因。(1) 样品通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜去除宿主细胞，且病毒浓缩物在进行 *psbA* 扩增前用 DNase 去除游离的 DNA；(2) 基于噬藻体和他们的宿主的平均 GC 含量进行区分(聚球藻噬藻体的 GC 含量由 46%–51%，而聚球藻宿主 GC 含量在 56%–62%<sup>[11]</sup>)；(3) 在 D1 蛋白内三肽元件(motif)的分布( $^R/_K\text{ETTXXXS}^Q/_H$ )<sup>[16]</sup>。本研究也采用 Chénard 和 Suttle<sup>[11]</sup>的处理分析方法，但是通过 DNase 对溶解态的 DNA 消化不彻底，即使是用 DNase 和 RNase 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 5.5 h，仍然存在着蓝藻源的 *psbA* 基因，或提高酶浓度可延长酶解时间，相应的条件应进一步优化。在日本稻田获得的 DNA 样品中也被细菌和真核生物源的 *psbA* 基因的污染，在获得的 46 条序列

中, 26 条 *psbA* 序列认为是噬藻体源<sup>[18]</sup>。稻田水体中蓝藻和病毒也存在着时间上的差异<sup>[20]</sup>, 而本研究仅调查东北稻田与日本稻田地域间的噬藻体群落的差异, 而未考虑时间上的变化, 也未调查东北稻田与日本稻田蓝藻多样性的差异, 有待深入研究探讨宿主与病毒间的互作关系。目前 *psbA* 基因仅在肌尾病毒和短尾病毒中存在, 而在长尾病毒中未发现<sup>[16]</sup>, 因此, 采用多个分子标记来调查环境中病毒基因多样性更加精确<sup>[17]</sup>。

综上所述, 我们首次以 *psbA* 基因作为分子标记, 采用 PCR-克隆测序技术对东北稻田水体噬藻体类群进行调查, 发现东北稻田水体中存在着新的 *psbA* 基因类群, 东北稻田水体噬藻体 *psbA* 基因群集组成与日本稻田水体不同, 这与我们以前以编码肌尾病毒衣壳组装蛋白的 *g20* 基因作为分子标记研究结果一致<sup>[19]</sup>。稻田水体中噬藻体 *psbA* 基因、病毒基因组成明显与海洋、湖泊的生态类群不同。

## 参 考 文 献

- [1] Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399(6736): 541–548.
- [2] Hambly E, Suttle CA. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 444–450.
- [3] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 69–114.
- [4] Wilhelm SW, Suttle CA. Viruses and nutrient cycles in the sea: viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, 1999, 49(10): 781–788.
- [5] Weinbauer MG, Rassoulzadegan F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 1–11.
- [6] Suttle CA. Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 801–812.
- [7] Zeidner G, Preston CM, Delong EF, Massana R, Post AF, Scanlan DJ, Beja O. Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by *psbA* analyses. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(3): 212–216.
- [8] Mann NH, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M. Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*, 2003, 424(6950): 741.
- [9] Paul JH, Sullivan MB. Marine phage genomics: what have we learned? *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(3): 299–307.
- [10] Sullivan MB, Lindell D, Lee JA, Thompson LR, Bielawski JP, Chisholm SW. Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS Biology*, 2006, 4(8): e234.
- [11] Sharon I, Tzahor S, Williamson S, Shmoish M, Man-Aharonovich D, Rusch DB, Yooseph S, Zeidner G, Golden SS, Mackey SR, Adir N, Weingart U, Horn D, Venter JC, Mandel-Gutfreund Y, Béjà O. Viral photosynthetic reaction center genes and transcripts in the marine environment. *The ISME Journal*, 2007, 1(6): 492–501.
- [12] Bailey S, Clokie MRJ, Millard A, Mann NH. Cyanophage infection and photoinhibition in marine cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 2004, 155(9): 720–725.
- [13] Bragg JG, Chisholm SW. Modeling the fitness consequences of a cyanophage-encoded photosynthesis gene. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3550.
- [14] Lindell D, Jaffe JD, Johnson ZI, Church GM, Chisholm SW. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*, 2005, 438(7064): 86–89.
- [15] Zeidner G, Bielawski JP, Shmoish M, Scanlan DJ, Sabehi G, Béjà O. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(10): 1505–1513.
- [16] 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.
- [17] Zhong X, Jacquet S. Prevalence of viral photosynthetic and capsid protein genes from cyanophages in two large and deep perialpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7169–7178.
- [18] Wang GH, Murase J, Asakawa S, Kimura M. Novel cyanophage photosynthetic gene *psbA* in the floodwater of a Japanese rice field. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(1): 79–86.



- [19] Jing RY, Liu JJ, Yu ZH, Liu XB, Wang GH. Phylogenetic distribution of the capsid assembly protein gene (*g20*) of cyanophages in paddy floodwaters in Northeast China. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88634.
- [20] Wang GH, 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.

## Genetic diversity of *psbA* of cyanophage from paddy floodwater in northeast China

Ruiyong Jing<sup>1, 2</sup>, Kun Cao<sup>1, 2</sup>, Junjie Liu<sup>1</sup>, Judong Liu<sup>1</sup>, Jian Jin<sup>1</sup>, Xiaobing Liu<sup>1</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, Heilongjiang Province, China

<sup>2</sup> College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China

**Abstract:** [Objective] To provide scientific data for studying the ecology of cyanophage, we studied the genetic diversity of *psbA* of cyanophage from paddy floodwater in northeast China and its phylogenetic positions. [Methods] Membrane separation and concentration of cyanophage, PCR-cloning-sequencing were applied to study the diversity of *psbA* of cyanophage from paddy floodwater in northeast China. [Results] In total 17 *psbA* sequences of cyanophage were obtained. Novel cyanophages were found by phylogenetic analysis. Compared to those of Japanese paddy floodwater, marine and lakes, *psbA* gene assemblage of paddy floodwater in northeast China was significantly different. [Conclusion] This is the first report to study genetic diversity of cyanophage from paddy floodwater in northeast China with a molecular marker of *psbA* by PCR-cloning-sequencing. The novel *psbA* assembly of cyanophage was found in paddy floodwater in northeast China.

**Keywords:** cyanophage, *psbA* gene, paddy floodwater

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41271262, 31300425) and by the Hundred-talents Project of Chinese Academy of Science

\*Corresponding author. Tel: +86-451-86602745; Fax: +86-451-86603736; E-mail: wanggh@iga.ac.cn

Received: 21 May 2016; Revised: 4 July 2016; Published online: 7 September 2016