



云南不同高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因多样性

赵恒, 刘玉珊, 陈彤, 刘丽*

昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

赵恒, 刘玉珊, 陈彤, 刘丽. 云南不同高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因多样性[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 760-774.

ZHAO Heng, LIU Yushan, CHEN Tong, LIU Li. Phylogenetic diversity of cyanophage *psbA* gene in the different plateau lakes in Yunnan Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 760-774.

摘要: 【目的】噬藻体(cyanophage)广泛存在于自然水体生态系统中, 通过侵染蓝藻进而调控蓝藻种群及群落结构, 具有重要生态功能和生态地位, 在控制蓝藻水华方面有巨大开发潜力。本研究旨在探究云南高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因多样性, 分析其系统进化地位, 为深入了解高原湖泊生态功能、开发利用噬藻体资源奠定理论基础。【方法】以云南高原主要湖泊滇池、抚仙湖和星云湖等为研究对象, 以 *psbA* 基因作为分子靶标, 对湖泊水体中噬藻体遗传多样性进行研究。【结果】从不同湖泊中共获得 100 条环境噬藻体 *psbA* 基因序列, 系统发育分析表明, 湖泊的噬藻体 *psbA* 基因序列与中国东湖、中国东北稻田、日本稻田等淡水中的环境噬藻体 *psbA* 基因亲缘关系较近, 与海洋环境噬藻体 *psbA* 基因亲缘关系较远; 抚仙湖中的噬藻体 *psbA* 基因多样性高于滇池、星云湖和异龙湖中的噬藻体 *psbA* 基因多样性; 云南高原湖泊中存在新的噬藻体类群; 各湖泊秋冬季节噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性差异不明显。【结论】云南主要高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性高, 与淡水环境噬藻体 *psbA* 基因亲缘关系较近, 且存在独特的噬藻体类群。

关键词: 高原湖泊; 噬藻体; 遗传多样性; *psbA* 基因

资助项目: 国家自然科学基金(31860028, 31360016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860028, 31360016).

*Corresponding author. Tel: +86-871-65920756, E-mail: liuli2272@163.com

Received: 2022-06-21; Accepted: 2022-08-27; Published online: 2022-09-19

Phylogenetic diversity of cyanophage *psbA* gene in the different plateau lakes in Yunnan Province

ZHAO Heng, LIU Yushan, CHEN Tong, LIU Li*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Objective] Cyanophages are ubiquitous in natural water ecosystems and have an important ecological status and function. They play a role in controlling cyanobacterial populations and community structure by infecting cyanobacteria, which indicates the great application potential of cyanophages in controlling cyanobacterial blooms. This study aims to explore the diversity and phylogenetic status of cyanophage *psbA* gene in the plateau lakes in Yunnan Province, so as to lay a theoretical foundation for further understanding the ecological role of cyanophages in plateau lakes and exploiting cyanophage resources. [Methods] The *psbA* gene was used as a molecular target to study the genetic diversity of cyanophages in Dianchi Lake, Fuxian Lake, and Xingyun Lake in Yunnan Province. [Results] A total of 100 *psbA* sequences of cyanophages were obtained from different lakes. The phylogenetic analysis showed that the *psbA* gene from the lakes had close genetic distance to those in the East Lake in China, the paddy water in northeast China, and the Japanese paddy floodwater, but were more distantly related to those in the marine waters. The diversity of cyanophage *psbA* gene in Fuxian Lake was higher than that in Dianchi Lake, Xingyun Lake, and Yilong Lake. The novel *psbA* assemblies of cyanophage existed in the plateau lakes in Yunnan Province. The genetic diversity of *psbA* gene showed no significant difference between autumn and winter. [Conclusion] The *psbA* gene of cyanophages in the main plateau lakes in Yunnan Province has high genetic diversity and is closely related to the *psbA* gene of cyanophage in freshwater environment. Moreover, there are novel *psbA* assemblies of cyanophages in the plateau lakes. **Keywords:** plateau lake; cyanophage; genetic diversity; *psbA* gene

噬藻体(cyanophage)能够特异性感染蓝藻, 是一类双链 DNA 病毒, 在自然水域中广泛存在, 具有丰富的遗传多样性^[1]。噬藻体与宿主蓝藻的新陈代谢和生命循环有密切关系, 在侵染过程中能引起宿主蓝藻的遗传变异, 影响水中微生物及浮游植物群落结构和多样性^[2], 在影响全球碳氮循环、介导与宿主间的基因转移方面起到了重要作用^[3-4], 是养分再生、元素循环的关键驱动力以及控制蓝藻季节性暴发的潜在生物制剂^[5-6]。

目前对不同噬藻体家族的基因多样性研究已经广泛开展, 如编码大肠杆菌 T4 型噬藻体衣壳组装蛋白的 *g20* 基因^[7-8]、编码 T7 型噬藻体短尾病毒核苷酸聚合酶的 *pol* 基因^[9]、编码光合系统 II 反应中心蛋白 D1 亚基的 *psbA* 基因^[10]。由于噬藻体与宿主蓝藻间的基因水平转移^[11]和交换重组, *psbA* 基因在噬藻体中广泛存在^[12], 在短尾科和肌尾科噬藻体中均有发现, Sharon 等^[13]的研究表明, 海洋表层水的 *psbA* 基因 60% 来源于噬藻体。噬藻体中的 *psbA*

基因具有保护宿主光合作用,使其免受光抑制的功能^[14],确保其增殖过程中能量的供应。Chénard 等^[15]对海洋和淡水中噬藻体 *psbA* 序列进行扩增,结果都显示出丰富的遗传多样性,*psbA* 基因已成为探索环境中噬藻体多样性和进化史的一种遗传标记^[16]。

云南省地处中国西南部的低纬度高原,湖泊众多,由于其特有的地理气候特征、丰富的生物多样性以及多民族间的交流活动,云南湖泊水体富营养化程度与其它区域存在明显的差别。国内对噬藻体的研究起步较晚,仅对部分水域环境噬藻体遗传多样性有过报道^[17-20],但对高原淡水湖泊噬藻体遗传多样性研究的相关报道十分有限。本文主要探究云南高原不同湖泊滇池、抚仙湖、星云湖等湖泊秋季和冬季水样中噬藻体 *psbA* 基因的多样性,以期进一步丰富我国淡水湖泊病毒资源,为开发利用噬藻体资源奠定基础,同时也为深入了解高原湖泊的生态功能、环境现状及生态环境治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 湖泊水样的采集与处理

于 2018 年秋、冬季节在滇池、星云湖和抚仙湖不同采样点采集表层水样(距水面 0.5 m 处)和底层水样(距水面 2 m 处),置于低温箱并迅速带回实验室,将表层水和底层水混匀。将水样依次通过 0.75 μm 滤纸、0.45 μm 及 0.22 μm 微孔滤膜过滤,用 6 万分子量的中空纤维膜组件对处理后的水样按 200:1 的比例进行浓缩,水样分装标记后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 水样中噬藻体基因组提取及 PCR 扩增

1.2.1 浓缩水样预处理

采用脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 处理浓缩水样以去除水样中游离

的蓝藻 DNA。利用蓝藻特异性的 ITS 基因^[21]对 DNase I 处理后的水样进行 PCR 扩增及鉴定,以确定水样中游离的蓝藻 DNA 是否去除完全。

1.2.2 噬藻体基因组提取及 *psbA* 基因的 PCR 扩增

取去除完游离蓝藻 DNA 的水样,使用病毒基因组提取试剂盒 Viral DNA Kit (Omega) 提取噬藻体 DNA。使用巢式引物: *psbA*-F1 (5'-GARTGGYTNTAYAAAYGGNG-3') 和 *psbA*-R1 (5'-CCRTTNAGGTTRAANGCCA-3'), *psbA*-F2 (5'-CAYTTCTAYCCNATYTGG-3') 和 *psbA*-R2 (5'-TCYNGACTGGTTGAAGTTGA-3') 扩增噬藻体 *psbA* 基因,产物约 580 bp。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 退火 30 s (*psbA1* 47 $^{\circ}\text{C}$, *psbA2* 50 $^{\circ}\text{C}$); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.3 胶回收、TA 克隆及序列测定

使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 PCR 产物纯化,PCR 纯化产物连接至 pEASY-T1 Cloning Vector 上,加入大肠杆菌 JM109 中转化。随机挑取 Amp⁺ 的 LB 平板上长出的菌落若干(15-20 个/样品),用通用引物进行菌落 PCR 快速鉴定,阳性菌液送至测序公司进行序列测定。

1.4 构建噬藻体 *psbA* 基因系统进化树

测序得到的噬藻体 *psbA* 基因的单克隆序列分别用 Chromas、BioEdit 进行校正。使用 BLAST 将得到的序列与数据库中收录的 *psbA* 基因进行比对分析,筛选出有效序列,用 IQTREE 2.1.4 构建湖泊水样与来自不同环境水样中噬藻体 *psbA* 基因的系统进化树 (phylogenetic tree),以分析云南省不同高原淡水湖泊中噬藻体的遗传多样性。本研究获得的 *psbA* 序列已提交至 NMDC 网站,序列号为 NMDCN00011LD-NMDCN00011OG。

1.5 *psbA* 基因 PCoA 分析

将云南高原湖泊的 *psbA* 序列与来自不同环境水样中噬藻体 *psbA* 基因进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA)。通过 PAUP 软件构建系统进化树, 用 Mothur 软件计算进化树中序列的 Unifrac 距离, 利用 ImageGP 在线程序绘制 PCoA 图。

2 结果与分析

2.1 不同湖泊水样中噬藻体 *psbA* 基因 PCR 扩增测序

滇池、抚仙湖、星云湖水样噬藻体 *psbA* 基因扩增结果于 580 bp 处有明显目的条带(图 1), PCR 产物经胶回收进行 TA 克隆并测序。从不同湖泊水样中共计获得 100 条不同的 *psbA* 序列, 包括滇池水样 39 条(秋季 25 条, 冬季 14 条), 抚仙湖水样 34 条(秋季 14 条, 冬季 20 条), 星云湖水样 27 条(秋季 16 条, 冬季 11 条)。

2.2 不同湖泊水样中噬藻体 *psbA* 基因 PCoA 分析

将从云南滇池、抚仙湖、星云湖获得的噬藻体 *psbA* 序列和本实验室前期获得的云南异龙湖噬藻体 *psbA* 序列^[22]与淡水环境、海洋环境和噬藻体的 *psbA* 序列(表 1)进行 PCoA 分析

(图 2)。海洋环境噬藻体 *psbA* 序列与分离培养的噬藻体 *psbA* 序列距离较近, 与淡水和云南高原湖泊噬藻体 *psbA* 序列距离较远, 分布较为集中; 滇池、抚仙湖和异龙湖噬藻体 *psbA* 序列与淡水环境噬藻体 *psbA* 序列距离较近, 分布较为分散; 星云湖噬藻体 *psbA* 序列与其他环境噬藻体 *psbA* 序列距离较远, 与抚仙湖和滇池的两簇序列距离较近, 且分布集中, 可能为云南高原湖泊独有类群。

2.3 不同湖泊水样中噬藻体 *psbA* 基因系统进化分析

psbA 基因编码光合系统 II 反应中心蛋白的 D1 亚基, 广泛存在于光合作用生物中, 通过以下方法可区分获得的 *psbA* 序列是否来源于噬藻体: (1) 噬藻体核酸提取前, 酶处理并且蓝藻 ITS 基因扩增结果为阴性; (2) 序列经 NCBI 网站上基于氨基酸水平进行 BLAST 比对, 相似度最高的为噬藻体 *psbA* 序列; (3) *psbA* 基因编码的氨基酸序列模型 R/KETTXXXSQ/H, 当 XXX 为 EQE、ENE、EEV、EEE、EDV、EVE、EQV 和 EDE 等时, 序列更可能是来自于病毒 D1 亚基^[13]; (4) 对噬藻体及宿主蓝藻的 *psbA* 序列进行 GC 含量分析, 其 GC 含量低于宿主蓝藻的 GC 含量^[12]。

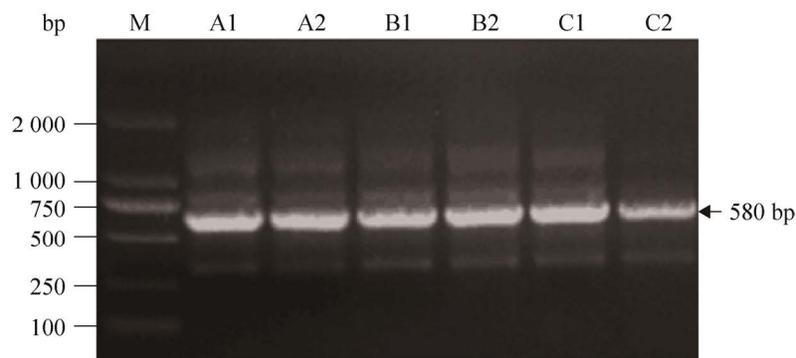


图 1 不同湖泊水样 *psbA* 基因 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *psbA* gene amplified by PCR in water samples from different lakes. M: DL2000 marker; A: Dianchi Lake; B: Fuxian Lake; C: Xingyun Lake.

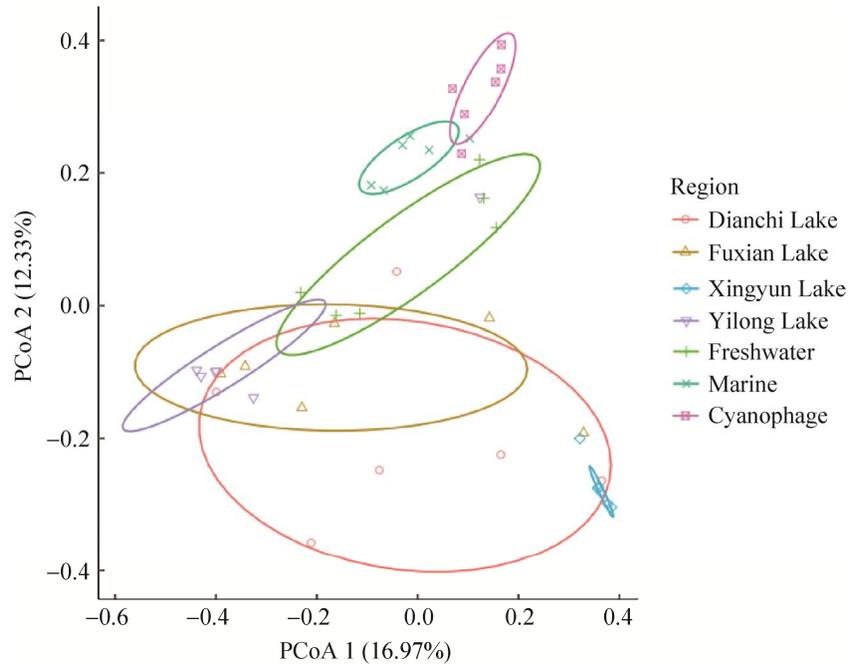


图 2 云南高原湖泊与其他环境噬藻体 *psbA* 序列 PCoA 分析

Figure 2 PCoA analysis of *psbA* sequences from cyanophage in Yunnan plateau lakes and other environments.

从滇池浓缩水样得到的 39 条序列 GC 含量在 45.5%到 50.2%之间, 对编码 D1 蛋白的氨基酸序列中的三肽元件 R/KETTXXXSQ/H 进行分析, 序列中含有 EEI、EIE、EEV、EQE、ENE 和 ESE 六种三肽元件。39 条序列构建的系统发育进化树可将 *psbA* 基因划分为 5 簇(图 3), 分别命名为 cluster DC- I -cluster DC- V, cluster DC- I 中的 GC 含量为 47.5%–49.7%, 主要三肽元件是 EEI (DCw-5 为 EIE); cluster DC-II 中的 GC 含量为 46.1%–49.2%, 三肽元件全部为 EEV; cluster DC-III 中的 GC 含量为 49.2%–50.2%, 三肽元件全部为 EQE; cluster DC-IV 中的 GC 含量为 45.7%–46.7%, 三肽元件全部为 EIE; cluster DC-V 中的 GC 含量为 48.0%–50.1%, 主要三肽元件是 ENE (DCw-1 为 ESE)。

从抚仙湖浓缩水样得到的 34 条序列 GC 含

量在 39.0%到 56.4%之间, 其氨基酸序列中含有 EEI、ESE、EDV、ETE、DNE、ENE、EQE 和 EIE 八种三肽元件。34 条序列构建的系统发育进化树可将 *psbA* 基因划分为 7 簇(图 4), 分别命名为 cluster FX- I -cluster FX- VII, cluster FX-I 中的 GC 含量为 48.4%–49.5%, 三肽元件全部为 EEI; cluster FX-II 中的 GC 含量为 54.2%–56.4%, 三肽元件全部为 ESE; cluster FX-III 中的 GC 含量为 44.6%–45.8%, 三肽元件全部为 EDV; cluster FX-IV 中的 GC 含量为 45.2%–45.3%, 三肽元件全部为 ETE; cluster FX-V 中的 GC 含量为 44.2%–44.5%, 三肽元件全部为 DNE; cluster FX-VI 中的 GC 含量为 39.0%–43.7%, 三肽元件全部为 ENE; cluster FX-VII 中的 GC 含量为 45.7%–50.7%, 主要三肽元件是 ENE (FXw-10 和 FXw-3 为 EQE, FXa-7 为 ESE, FXw-12 为 EIE)。

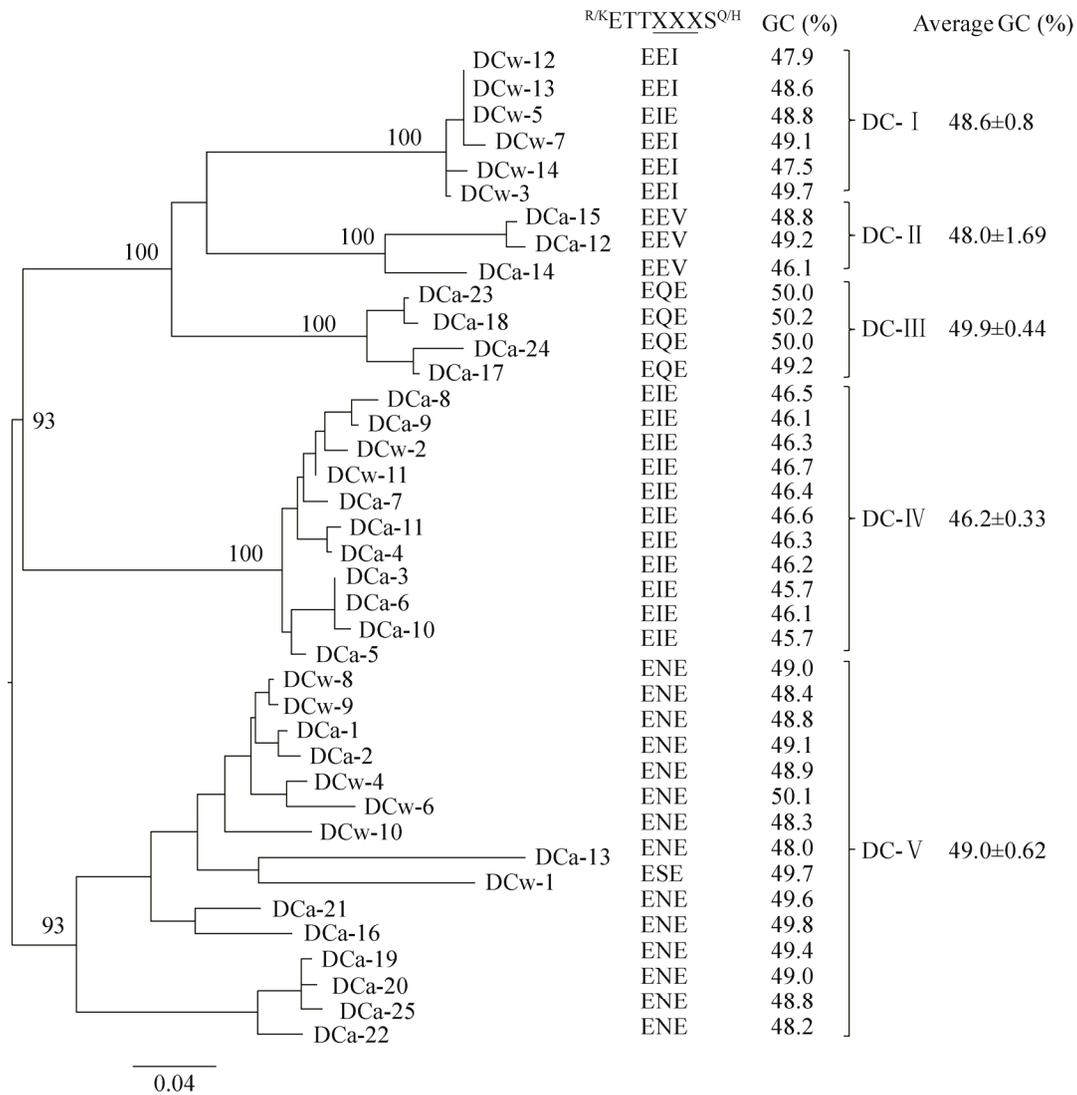


图3 滇池噬藻体 *psbA* 序列同源关系进化树、GC 占比及 *psbA* 基因编码的氨基酸序列模型

Figure 3 Homologous phylogenetic tree, GC proportion and the amino acid sequences of cyanophage *psbA* gene in Dianchi Lake. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset; The scale bar indicates that the number of nucleotide substitutions at each site is 0.04.

从星云湖浓缩水样得到的 27 条序列 GC 含量在 44.6%到 51.4%之间, 其氨基酸序列中含有 EIE、ETE 和 ENE 三种三肽元件。27 条序列构建的系统发育进化树中(图 5), 序列集中为一大簇, 除三肽元件为 ETE (XYa-6)和 ENE (XYa-7) 2 条序列外, 24 条三肽元件为 EIE 的序列和 1 条三肽元件为 ETE (XYa-7)的序列亲缘

关系最为接近。

将从云南滇池、抚仙湖、星云湖获得的 100 条噬藻体 *psbA* 序列和本实验室前期获得的 15 条云南异龙湖噬藻体 *psbA* 序列^[22]构建系统发育进化树(图 6)以分析云南高原湖泊的噬藻体 *psbA* 基因多样性, 所有的序列可划分成 4 个进化簇(cluster I-IV)。抚仙湖的 *psbA* 基因序列在

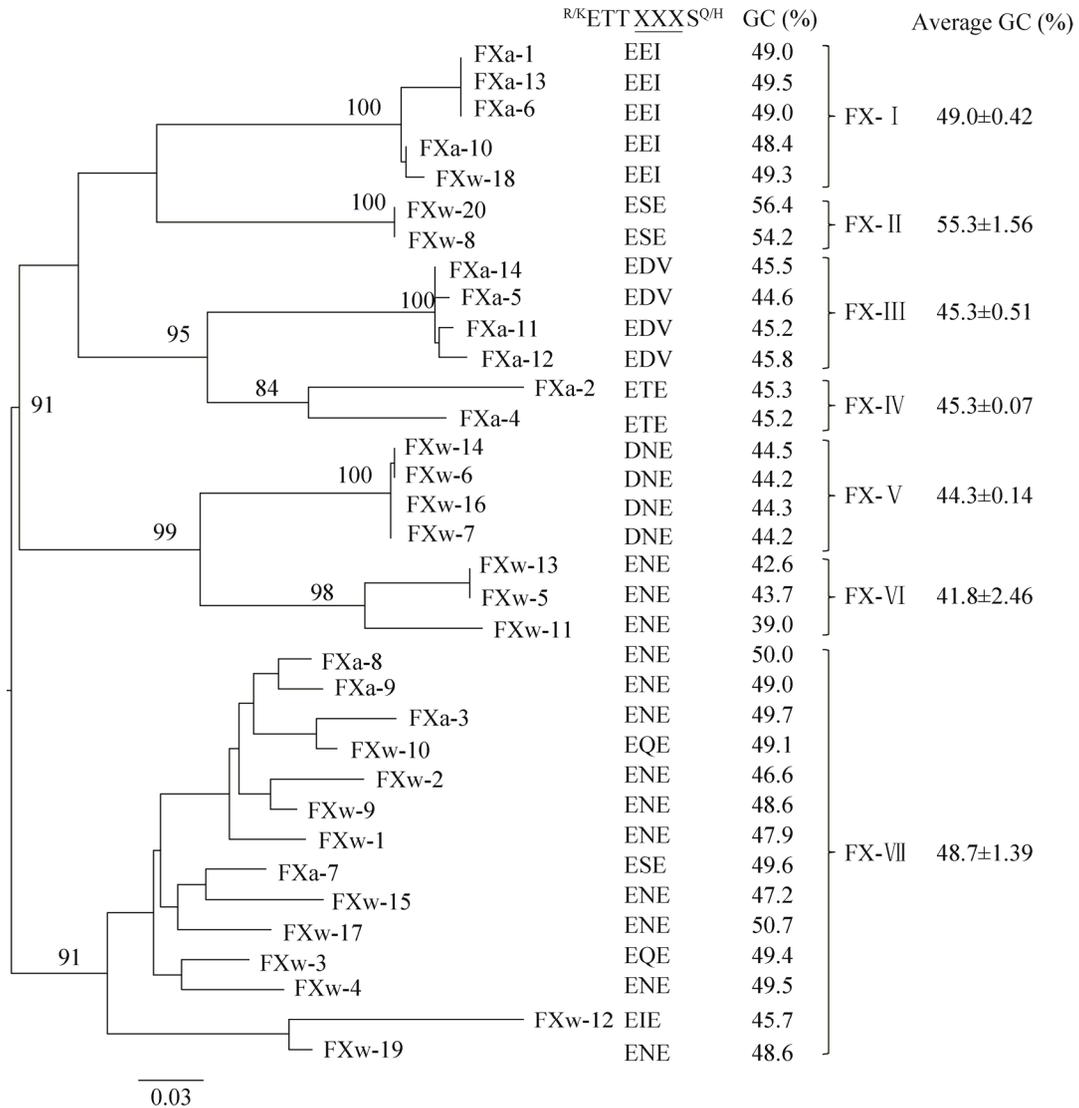


图 4 抚仙湖噬藻体 *psbA* 序列同源关系进化树、GC 占比及 *psbA* 基因编码的氨基酸序列模型

Figure 4 Homologous phylogenetic tree, GC proportion and the amino acid sequences of cyanophage *psbA* gene in Fuxian Lake. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset; The scale bar indicates that the number of nucleotide substitutions at each site is 0.03.

4 个簇中均有分布，滇池的 *psbA* 基因序列分布在 Cluster I、II、III，异龙湖的 *psbA* 基因序列分布在 Cluster I、IV，星云湖的 *psbA* 基因序列全部分布在 Cluster III。从不同季节来看，滇池秋季 *psbA* 序列分布在 Cluster I、II、III 中，冬季 *psbA* 序列分布在 Cluster I、II 中；抚仙湖

秋季 *psbA* 序列分布在 Cluster I、II、IV 中，冬季 *psbA* 序列分布在 Cluster I、II、III 中；星云湖秋、冬季 *psbA* 序列全部分布在 Cluster III 中。抚仙湖和滇池的 *psbA* 序列多样性更为丰富，异龙湖次之，星云湖的 *psbA* 序列多样性最为单一。

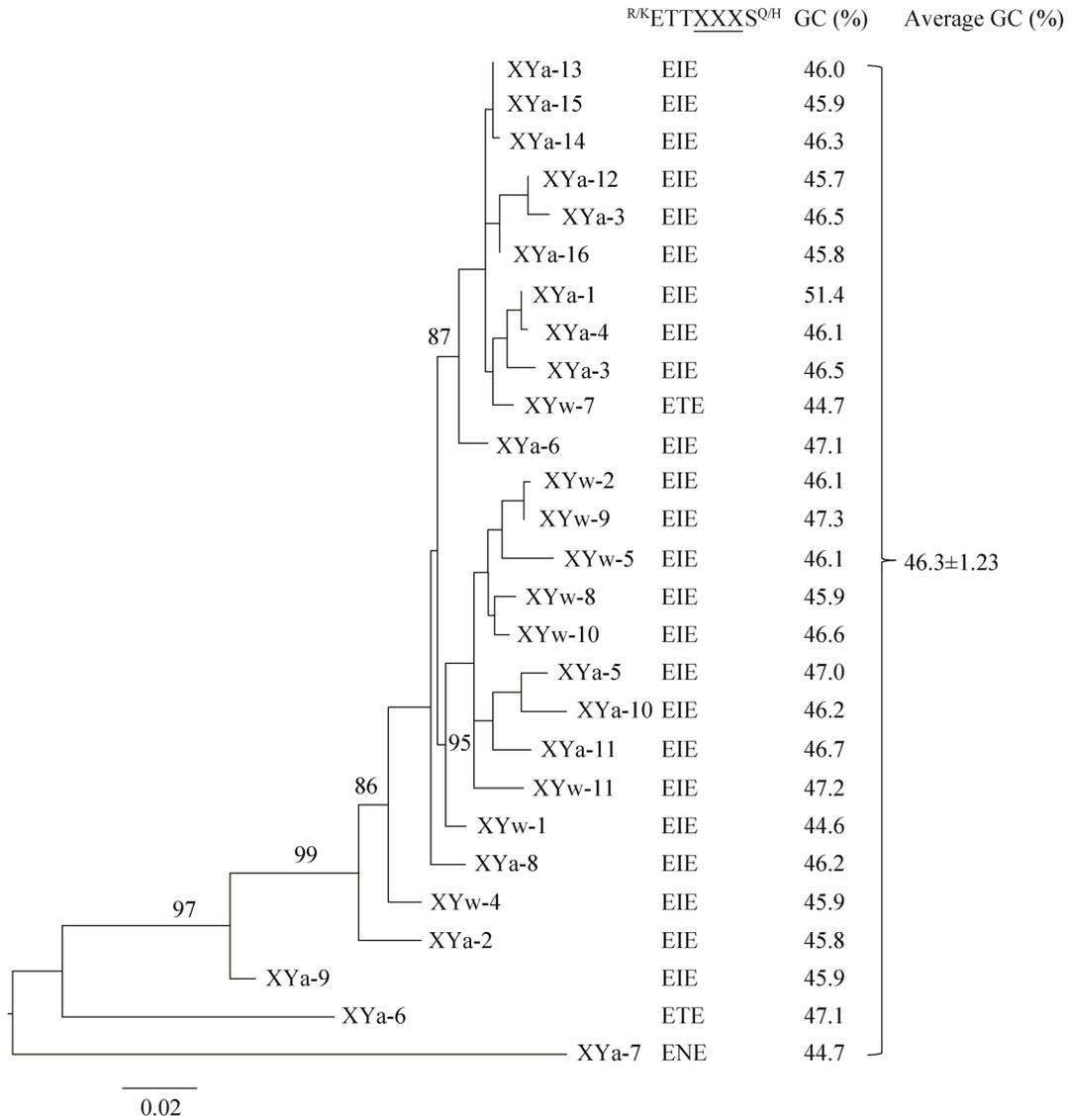


图 5 星云湖噬藻体 *psbA* 序列同源关系进化树、GC 占比及 *psbA* 基因编码的氨基酸序列模型

Figure 5 Homologous phylogenetic tree, GC proportion and the amino acid sequences of cyanophage *psbA* gene in Xingyun Lake. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset; The scale bar indicates that the number of nucleotide substitutions at each site is 0.02.

将云南高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因序列和 NCBI 数据库中的海洋、淡水和噬藻体 *psbA* 基因参考序列(表 1)进行系统进化分析, 所有的序列在系统发育进化树可划分为 7 个簇(图 7, cluster A-G)。其中, cluster A 包括来自挪威等海洋环境噬藻体 *psbA* 序列和来自海洋的噬藻

体分离株 *psbA* 序列(subcluster A1)以及来自日本稻田、中国东湖的淡水环境噬藻体 *psbA* 序列(subcluster A2); Cluster B 包括本研究获得的滇池、抚仙湖、星云湖 *psbA* 序列和日本稻田环境噬藻体 *psbA* 序列; Cluster C 包括滇池、抚仙湖 *psbA* 序列和中国东北稻田等淡水环境

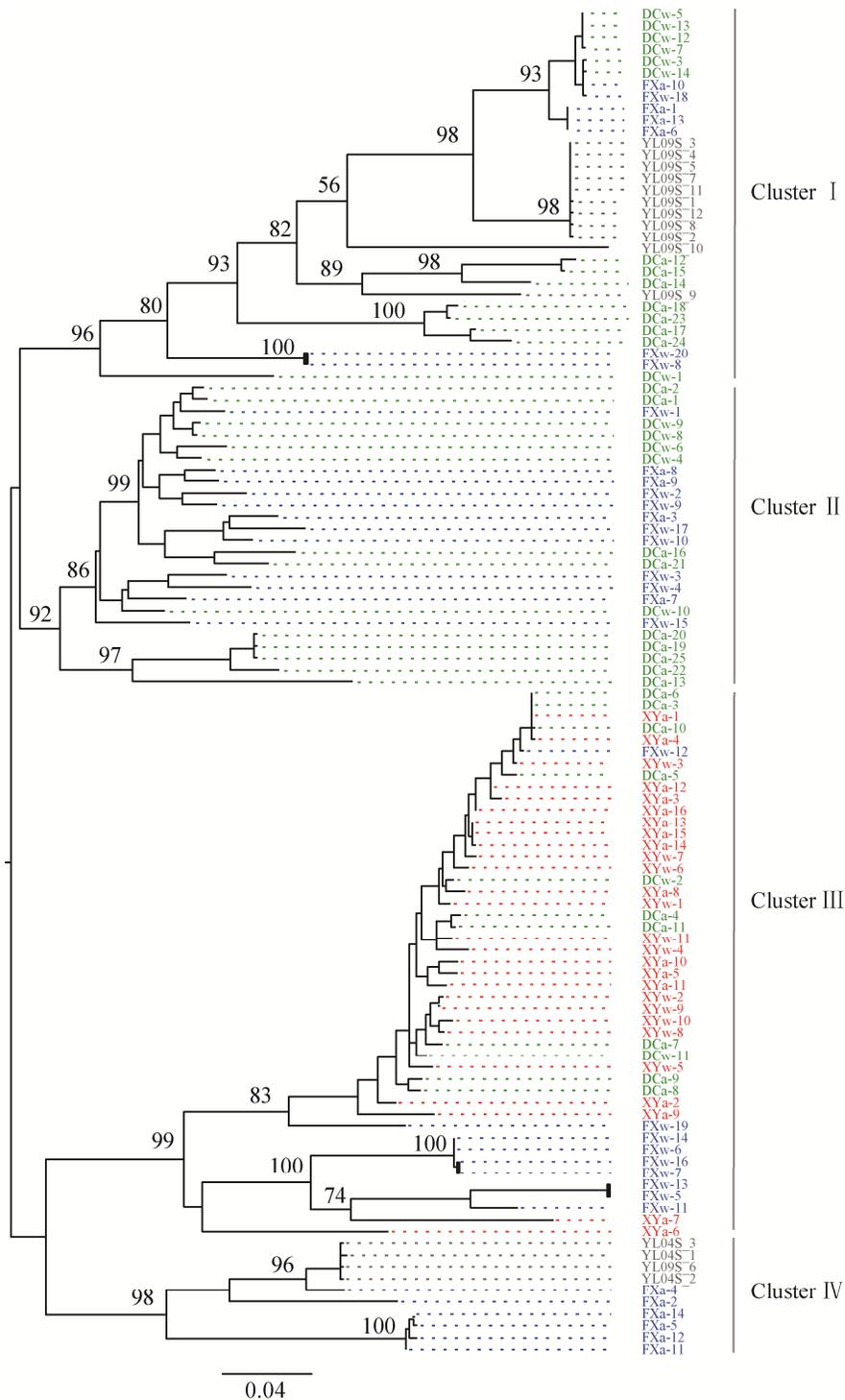


图 6 滇池、抚仙湖、星云湖、异龙湖噬藻体 *psbA* 基因系统发育进化树

Figure 6 Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of cyanophage *psbA* nucleotide sequence from Dianchi Lake, Fuxian Lake, Xingyun Lake and Yilong Lake. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset; The scale bar indicates that the number of nucleotide substitutions at each site is 0.04.

表 1 用于构建系统发育进化树的 *psbA* 参考序列Table 1 *psbA* reference sequence for constructing phylogenetic tree

Environment	Location (s)	Prefix of sequence label	No. of sequences	GenBank accession No.	Reference
Marine	Hawaii	Hwi	20	DQ473720–DQ473739	[12]
	Norway	Nw	20	DQ787237–DQ787256	[23]
	Mediterranean Sea	MS	20	DQ401466–DQ401485	[13]
	Red Sea	RS	5	AY713428–AY713432	[24]
	Arctic Ocean	AO	8	EU258956–EU258959, EU258966, EU258967, EU258978, EU258980	[15]
	Northeast Pacific	NP	15	EU258960–EU25896, EU258968–EU25897, EU258979	[15]
Freshwater	Japanese paddy floodwater	JPF	40	AB482028–AB482067	[25]
	French Lake Annecy and Lake Bourget	FAB	20	KC626440–KC626459	[16]
	Lake Erie	LE	20	EU404119–EU404138	[26]
	East Lake, China	EL	19	KF709165–KF709183	[18]
	Paddy water in Northeast China	NCPF	17	KX443367–KX443383	[27]
	Cyanophage	<i>Prochlorococcus cyanophage</i>	PC	19	DQ473648–DQ473666
<i>Synechococcus cyanophage</i>		SC	20	DQ473668–DQ473672, EU256551–EU256565	[15]

噬藻体 *psbA* 序列; Cluster D 包括滇池、抚仙湖 *psbA* 序列和日本稻田环境噬藻体 *psbA* 序列; Cluster E 包括滇池、抚仙湖、异龙湖 *psbA* 序列和日本稻田等淡水环境噬藻体 *psbA* 序列 (subcluster E1) 以及地中海等海洋环境噬藻体 *psbA* 序列 (subcluster E2); Cluster F 包括抚仙湖、异龙湖 *psbA* 序列和法国安纳西湖和布尔热湖环境噬藻体 *psbA* 序列以及 2 条地中海环境噬藻体 *psbA* 序列; Cluster G 包括地中海等海洋环境噬藻体 *psbA* 序列和来自海洋的噬藻体分离株 *psbA* 序列。

云南不同高原湖泊噬藻体 *psbA* 序列全部分布在淡水环境噬藻体 *psbA* 基因集群中 (Cluster B–F), 其中抚仙湖 *psbA* 序列分布于 Cluster B–F 五个簇中, 滇池序列分布于 Cluster B–E 四个簇中, 星云湖和异龙湖序列分布于 Cluster B 和 Cluster E–F, 与海洋环境噬藻体 *psbA* 基因集群和聚球藻噬藻体、原绿球藻噬藻

体 *psbA* 基因集群进化关系较远; 滇池 *psbA* 序列和抚仙湖 *psbA* 序列与多种淡水环境噬藻体 *psbA* 基因集群进化关系较近, 异龙湖 *psbA* 序列与中国东北稻田和法国安纳西湖和布尔热湖环境噬藻体 *psbA* 序列进化关系较近, 在 Cluster E 中形成了与前期研究^[22]中相同的亚簇, 星云湖 *psbA* 基因多样性较单一, 多数序列与部分滇池、抚仙湖序列形成了一个较为独立的进化分支(B1), 推测为新的噬藻体 *psbA* 基因类群。

结合图 3–5 可知, 星云湖 *psbA* 序列中有 88.9% 的序列三肽元件为 EIE, 并且单独成簇, 仅与日本稻田环境噬藻体 *psbA* 基因进化关系较近, 与其他淡水环境噬藻体 *psbA* 基因进化距离较远; 滇池、抚仙湖 *psbA* 序列三肽元件种类较多, 在系统发育树中分布广泛, 与日本稻田、中国东北稻田、中国东湖、北美伊利湖、法国安纳西湖和布尔热湖环境噬藻体

psbA 基因皆有相近的亲缘关系，显示出较高的基因多样性。虽都是云南高原淡水湖泊，但滇池、抚仙湖噬藻体 *psbA* 基因多样性显著高于异龙湖和星云湖，星云湖噬藻体 *psbA* 基因最为单一。此外，淡水环境、海洋环境和原绿球藻、聚球藻噬藻体的 *psbA* 基因分布较为独立，淡水环境噬藻体 *psbA* 基因分布于 Cluster

B-F，海洋环境噬藻体 *psbA* 基因分布于 Cluster G 和 Cluster A1、E2 中，原绿球藻、聚球藻噬藻体 *psbA* 基因分布于 Cluster G 和 Cluster A1，海洋环境噬藻体 *psbA* 基因与原绿球藻、聚球藻噬藻体 *psbA* 基因进化距离较近，两者与淡水环境噬藻体 *psbA* 基因进化距离较远，不同生态环境中的噬藻体 *psbA* 基因进化相对独立。

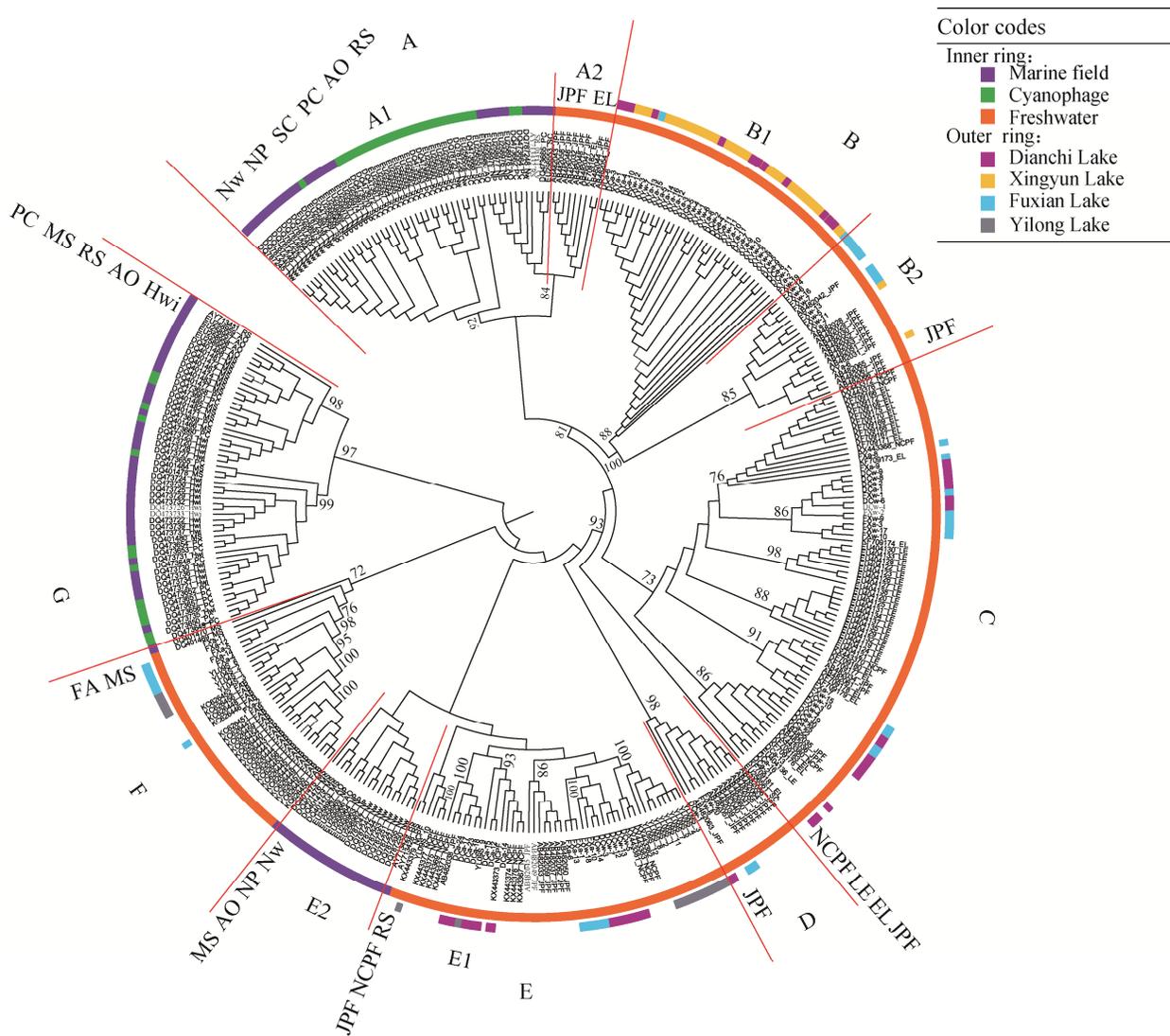


图7 滇池、抚仙湖、星云湖、异龙湖与其他环境噬藻体 *psbA* 基因系统发育进化树

Figure 7 Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of cyanophage *psbA* nucleotide sequence from Dianchi Lake, Fuxian Lake, Xingyun Lake, Yilong Lake and other environments. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset.

将云南高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因序列与稻田、湖泊和海洋环境的噬藻体 *psbA* 基因序列分别构建系统发育进化树(图 8)进一步分析高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因的独特性, 云南高原湖泊噬藻体 *psbA* 基因与稻田和湖泊环境噬藻体 *psbA* 基因亲缘关系较近(图 8A, 8B), 与海洋环境噬藻体 *psbA* 基因关系较远(图 8C), 星云湖和部分滇池、抚仙湖的噬藻体 *psbA* 序列在各个树图中都出现了相同的集群, 可能是高原湖泊与其他环境海拔及经纬度的不同, 使其具有独特的噬藻体 *psbA* 基因。

3 讨论与结论

蓝藻是稻田、湖泊和海洋等生态系统的重要组成部分, 能特异性感染蓝藻的噬藻体一直是研究热点。随着分子生物学技术的进步, 对噬藻体的遗传多样性研究取得了显著进展, Yeo 等^[28]对编码大肠杆菌 T4 型噬菌体衣壳组装蛋白的 *g20* 基因进行扩增, 系统发育分析显示新加坡克兰芝水库噬藻体丰富的遗传多样性, 但由于 *g20* 基因只存在于肌尾科噬藻体中, 使

用 *g20* 基因研究噬藻体遗传多样性具有一定的局限性; Wang 等^[29]对编码 T7 型噬藻体短尾病毒核苷酸聚合酶的 *pol* 基因进行扩增, 在东北稻田水体中发现了新的短尾噬藻体 *pol* 基因类群; Yoshida 等^[30]对编码噬藻体 MA-LMM01 尾鞘蛋白的 *g91* 基因进行定量扩增, 发现 Mikata 湖中铜绿微囊藻减少时噬藻体数量有明显上升。本研究采用在噬藻体中广泛存在且十分保守的光合作用基因 *psbA* 作为靶标基因, 对云南主要高原湖泊滇池、抚仙湖、星云湖和异龙湖进行了噬藻体遗传多样性的研究, 结果表明 *psbA* 基因很好地揭示了噬藻体的遗传多样性。

由于靶标 *psbA* 基因在蓝藻和噬藻体之间存在基因转移^[1], 因此确定 *psbA* 基因的来源是本研究的一个重点。按前述方法首先对采集的水样经过多层微孔滤膜过滤, 除去蓝藻等细胞型生物, 超滤浓缩后用 DNase 处理去除游离的蓝藻 DNA, 用蓝藻 ITS 基因扩增为阴性后再进行噬藻体 DNA 提取; 其次噬藻体 *psbA* 基因的 GC 含量低于其宿主 *psbA* 基因的 GC 含量(聚球

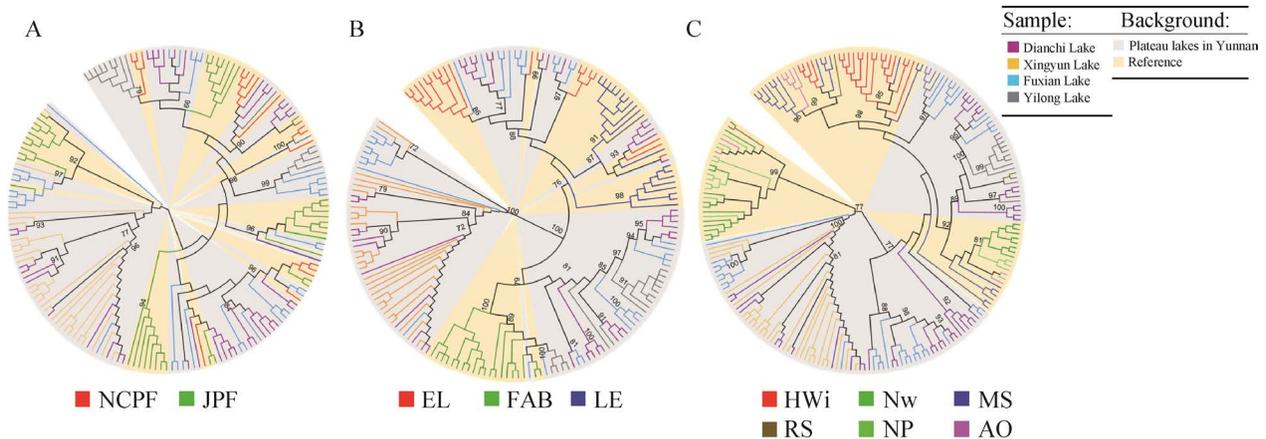


图 8 云南高原湖泊与其他环境噬藻体 *psbA* 基因系统发育进化树

Figure 8 Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of cyanophage *psbA* nucleotide sequence from plateau lakes in Yunnan Province and other environments. The number of tree branches is the bootstrap value of the reliability of tree branching by setting 1 000 repeated sampling of the dataset. A: Paddy. B: Lake. C: Marine.

藻噬藻体 GC 含量为 46%–51%，其宿主 GC 含量为 56%–62%)^[12]，本研究得到的所有 *psbA* 基因序列仅有 2 条 GC 含量超过 51.4%，GC 含量较低；最后通过 *psbA* 基因编码的氨基酸序列模型 R/KETTXXXSQ/H 进行区分，荆瑞勇等^[27]发现东北稻田水体中的 *psbA* 基因存在 EEV、ESE、EAE、ETE、EVE 和 ENE 六种三肽元件，Zhong 等^[16]发现法国安纳西湖和布尔热湖水体中的 *psbA* 基因存在 ETE、ESE 和 EFE 三种三肽元件，本研究中的滇池和抚仙湖水体中的 *psbA* 基因分别含有 6 种和 8 种三肽元件，星云湖水体中的 *psbA* 基因含有 3 种三肽元件，云南异龙湖水体中的 *psbA* 基因存在 EEV 和 ETE 两种三肽元件^[22]，滇池和抚仙湖中噬藻体 *psbA* 基因多样性高于异龙湖和星云湖中噬藻体 *psbA* 基因多样性在系统发育树中也得到印证，云南滇池、抚仙湖和星云湖还存在其他淡水水体少有报道的 EIE，表明 3 个湖泊可能存在独特的噬藻体 *psbA* 基因类群。

滇池、抚仙湖、星云湖和异龙湖 4 个湖泊的噬藻体 *psbA* 基因序列多样性研究发现，淡水环境和海洋环境噬藻体 *psbA* 基因进化距离较远，不同环境噬藻体 *psbA* 基因存在较大差异，*psbA* 基因类群分布与所处环境有很大关系。4 个湖泊的噬藻体 *psbA* 基因与来自淡水湖泊、稻田水体中的 *psbA* 基因更为相似，与海洋环境噬藻体 *psbA* 基因进化距离较远，淡水环境噬藻体可能具有共同的起源。Chénard 等^[15]对海洋和淡水中噬藻体 *psbA* 基因研究发现，淡水和海洋中的噬藻体 *psbA* 基因具有不同的进化历史，不同地理位置的噬藻体 *psbA* 基因有其独特的进化分枝。Wang 等^[31]河口环境分离到的聚球藻噬藻体进行 *psbA* 基因研究发现，河口环境聚球藻噬藻体 *psbA* 基因与海洋聚球藻及其噬藻体 *psbA* 基因显著不同，

两者有独立的进化关系。地理位置差异可能是海洋和淡水噬藻体 *psbA* 基因集群存在较大差异的重要因素，不同水体中的 *psbA* 基因存在一定差异。

湖泊的噬藻体 *psbA* 基因组成差异与环境中的噬藻体种类有关。Wang 等^[25]通过对日本稻田噬藻体 *psbA* 基因进行研究发现，噬藻体遗传多样性与蓝藻多样性呈正比，滇池和抚仙湖噬藻体 *psbA* 基因多样性丰富，滇池和抚仙湖可能具有种类更为丰富的蓝藻群落，异龙湖和星云湖的蓝藻多样性可能更单一。从采样的不同季节来看，滇池、抚仙湖和星云湖的噬藻体 *psbA* 基因差异并不显著，可能是 3 个湖泊地理位置较近，且同处云南高原，秋冬季节温差不大，致使噬藻体群落无明显变化。

综上所述，基于 *psbA* 基因对云南省不同高原淡水湖泊的噬藻体遗传多样性的分析表明，4 个湖泊水体中噬藻体 *psbA* 基因类群与淡水环境噬藻体 *psbA* 基因类群进化距离较近，且存在新的噬藻体 *psbA* 基因类群。秋冬季节噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性差异不明显，滇池和抚仙湖噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性较为丰富，异龙湖和星云湖噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性较为单一。

参考文献

- [1] 刘腾腾, 刘丽, 魏大巧, 夏雪山. 噬藻体和蓝藻间的基因转移及协同进化作用[J]. 生物技术通报, 2011(7): 12-17.
LIU TT, LIU L, WEI DQ, XIA XS. The role of horizontal gene transfer and co-evolution mechanism between cyanophage and cyanobacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(7): 12-17 (in Chinese).
- [2] WOMMACK KE, COLWELL RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2000, 64(1): 69-114.
- [3] OU T, GAO XC, LI SH, ZHANG QY. Genome analysis

- and gene *nbla* identification of *Microcystis aeruginosa* myovirus (MaMV-DC) reveal the evidence for horizontal gene transfer events between cyanomyovirus and host[J]. *The Journal of General Virology*, 2015, 96(12): 3681-3697.
- [4] JOVER LF, EFFLER TC, BUCHAN A, WILHELM SW, WEITZ JS. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(7): 519-528.
- [5] CUI N, YANG F, ZHANG JT, SUN H, CHEN Y, YU RC, CHEN ZP, JIANG YL, HAN SJ, XU XD, LI Q, ZHOU CZ. Capsid structure of *Anabaena* cyanophage A-1(L)[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(24): e0135621.621.
- [6] CHENG K, FRENKEN T, BRUSSAARD CPD, van de WAAL DB. Cyanophage propagation in the freshwater *Cyanobacterium phormidium* is constrained by phosphorus limitation and enhanced by elevated pCO₂[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 617.
- [7] 李伟, 李睿瑞, 荆瑞勇, 张海军, 胡鹏飞, 王丽艳. 大庆湿地可培养噬藻体的分离及其相关基因的系统进化分析[J]. *微生物学报*, 2016, 56(5): 824-834.
- LI W, LI RR, JING RY, ZHANG HJ, HU PF, WANG LY. Isolation and phylogenetic analysis of related genes of cultivable cyanophages in Daqing Wetland[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(5): 824-834 (in Chinese).
- [8] 荆瑞勇, Makoto Kimura, 王光华. 不同自然环境下噬藻体 *g20* 基因多样性研究进展[J]. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1149-1157.
- JING RY, KIMURA M, WANG GH. Genetic diversity of capsid assembly protein genes (*g20*) of cyanophage in different natural environment—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1149-1157 (in Chinese).
- [9] JIANG T, GUO C, WANG M, WANG MW, ZHANG XR, LIU YD, LIANG YT, JIANG Y, HE H, SHAO HB, MCMINN A. Genome analysis of two novel *Synechococcus* phages that lack common auxiliary metabolic genes: possible reasons and ecological insights by comparative analysis of cyanomyoviruses[J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 800.
- [10] FUCHSMAN CA, CARLSON MCG, GARCIA PRIETO D, HAYS MD, ROCAP G. Cyanophage host-derived genes reflect contrasting selective pressures with depth in the oxic and anoxic water column of the eastern tropical north Pacific[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(6): 2782-2800.
- [11] 高恶斌, 董一鸣. 噬藻体遗传多样性及其分子生态学研究现状与展望[J]. *生态科学*, 2016, 35(2): 166-173.
- GAO EB, DONG YM. Advances in researches on cyanophage genetic diversity and molecular ecology[J]. *Ecological Science*, 2016, 35(2): 166-173 (in Chinese).
- [12] 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[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(8): e234.
- [13] 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[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(6): 492-501.
- [14] BAILEY S, CLOKIE MRJ, MILLARD A, MANN NH. Cyanophage infection and photoinhibition in marine cyanobacteria[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(9): 720-725.
- [15] CHÉNARD C, SUTTLE CA. Phylogenetic diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene *psbA* in marine and freshwaters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5317-5324.
- [16] ZHONG X, JACQUET S. Prevalence of viral photosynthetic and capsid protein genes from cyanophages in two large and deep perialpine lakes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7169-7178.
- [17] ZHENG Q, JIAO NZ, ZHANG R, CHEN F, SUTTLE CA. Prevalence of *psbA*-containing cyanobacterial podoviruses in the ocean[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3207.
- [18] Ge XY, Wu YQ, Wang MN, Wang J, Wu LJ, Yang XL, Zhang YJ, Shi ZL. Viral metagenomics analysis of planktonic viruses in East Lake, Wuhan, China[J]. *Virologica Sinica*, 2013, 28(5): 280-290.
- [19] 王粟萍, 陈学梅, 魏云林, 张琦, 季秀玲. 纳帕海高原湿地噬藻体 *g20* 基因系统发育多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2574-2582.
- WANG SP, CHEN XM, WEI YL, ZHANG Q, JI XL. Phylogenetic diversity of cyanophages *g20* gene in Napahai Plateau wetland in China[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2574-2582 (in Chinese).

- [20] 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[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88634.
- [21] 彭玉辅. 滇池水域微藻种群变化、食藻原生动物和溶藻细菌分离纯化及初步研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2012.
- PENG YF. Changes of phytoplankton population of Lake Dianchi, isolation and preliminary study on protozoan and algicidal bacteria[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [22] 李春筱, 刘婷婷, 刘玉珊, 刘丽. 云南高原异龙湖噬藻体 *psbA* 基因遗传多样性研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2019, 35(10): 1322-1329.
- LI CX, LIU TT, LIU YS, LIU L. Phylogenetic diversity of cyanophage *psbA* gene in the plateau eutrophic Yilong Lake in Yunnan Province[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2019, 35(10): 1322-1329 (in Chinese).
- [23] SANDAA RA, LARSEN A. Seasonal variations in virus-host populations in Norwegian coastal waters: focusing on the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4610-4618.
- [24] ZEIDNER G, BIELAWSKI JP, SHMOISH M, SCANLAN DJ, SABEHI G, BÉjâ O. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(10): 1505-1513.
- [25] WANG GH, MURASE J, ASAKAWA S, KIMURA M. Novel cyanophage photosynthetic gene *psbA* in the floodwater of a Japanese rice field[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(1): 79-86.
- [26] WILHELM SW, MATTESON AR. Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences[J]. *Freshwater Biology*, 2008, 53(6): 1076-1089.
- [27] 荆瑞勇, 曹焜, 刘俊杰, 刘居东, 金剑, 刘晓冰, 王光华. 东北稻田水体噬藻体 *psbA* 基因多样性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(1): 131-139.
- JING RY, CAO K, LIU JJ, LIU JD, JIN J, LIU XB, WANG GH. Genetic diversity of *psbA* of cyanophage from paddy floodwater in northeast China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 131-139 (in Chinese).
- [28] YEO BH, GIN KYH. Population dynamics of cyanomyovirus in a tropical eutrophic reservoir[J]. *Microbes and Environments*, 2015, 30(1): 12-20.
- [29] WANG GH, LIU JJ, YU ZH, JIN J, LIU XB. Unique distribution of cyanobacterial podoviruses and their potential hosts in a paddy field of northeast China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 331-334.
- [30] YOSHIDA M, YOSHIDA T, KASHIMA A, TAKASHIMA Y, HOSODA N, NAGASAKI K, HIROISHI S. Ecological dynamics of the toxic bloom-forming *Cyanobacterium microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3269-3273.
- [31] WANG K, CHEN F. Prevalence of highly host-specific cyanophages in the estuarine environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(2): 300-312.