



## 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

李伟, 李睿瑞, 荆瑞勇\*, 张海军, 胡鹏飞, 王丽艳

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】揭示大庆湿地可培养蓝藻噬菌体遗传基因多样性, 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】以鱼腥藻(*Anabaena* PCC7120)为宿主, 采用液体富集和双层平板法分离大庆湿地水体中可培养的噬藻体, 提取噬藻体混合液的DNA, PCR扩增噬藻体编码衣壳组装蛋白的g20基因和编码T7型短尾病毒的核糖体聚合酶的pol基因, 克隆测序, 构建系统进化树, 明确可培养噬藻体相关基因的系统进化地位。【结果】克隆测序获得1条g20基因序列, 4条pol基因序列。系统进化分析表明, 获得g20序列隶属于可培养噬藻体类群(Cluster δ)中。而3条pol基因与我国吉林碱性稻田水体噬藻体类群(PG-Pol-I和PG-Pol-II)更相近, 另一条pol序列形成独立的进化分枝。【结论】这是首次调查大庆湿地水体侵染鱼腥藻的可培养噬藻体的g20和pol基因, 初步确认以鱼腥藻(*Anabaena* PCC7120)为宿主的可培养噬藻体g20基因归属于Cluster δ中, 而大庆湿地可培养噬藻体的pol基因与我国大安稻田水体pol基因相近。

**关键词:** 大庆湿地, 可培养噬藻体, 鱼腥藻, 系统进化

噬藻体是侵染蓝藻的细菌病毒, 在环境中分布广泛, 多样性丰富, 在调节水体中蓝藻种群的密度、多样性及生物地球化学循环起重要作用<sup>[1]</sup>。2002年我国首次成功分离第1株噬藻体病毒株以来, 在噬藻体的生物学特性、分离鉴定等方面开展了大量的研究<sup>[2-5]</sup>。至目前为止, 可培养噬藻体菌株较少, 尤其在淡水生态系统噬藻体分离株更少<sup>[6]</sup>。近年来, 基于噬藻体某些噬菌体家簇的氨基酸保守序列设计简并性引物来调查环境中噬藻

体基因多样性成为当前研究热点<sup>[7]</sup>。

目前, 研究噬藻体多样性的分子标志有编码肌尾噬藻体衣壳组装蛋白的g20基因<sup>[8]</sup>、编码DNA聚合酶的pol基因<sup>[9]</sup>及编码光合反应中心蛋白D1亚基的psbA基因<sup>[10]</sup>等。以g20基因<sup>[11-16]</sup>、pol基因<sup>[9,17-19]</sup>及psbA基因<sup>[10,20]</sup>为分子标记在海洋<sup>[11-12,15,17-18]</sup>、淡水<sup>[20]</sup>和稻田<sup>[13-14,16,19]</sup>生态系统中研究噬藻体多样性已有很多报道。通过大量的环境样品调查发现有很多的来自海洋、淡水湖泊、稻田生态系统中噬

基金项目: 大学生创新创业训练计划(201410223024); 校博士启动基金(XDB2015-19); 国家自然科学基金(31300425)

\*通信作者。Tel: +86-459-6819299-810; E-mail: jry\_2002@126.com

收稿日期: 2015-07-17; 修回日期: 2015-09-02; 网络出版日期: 2015-12-09

藻体基因类群。这些来自环境样品中的基因是否来自于噬藻体需要通过传统的分离培养方法进一步验证<sup>[21]</sup>。因此, 采用液体培养基或双层平板法分离纯化环境中的噬藻体可深入了解噬藻体相关基因及其宿主的相互关系<sup>[22-25]</sup>。但一些噬藻体分离2-3代时, 侵染能力将下降<sup>[26]</sup>。基于此, 本文以大庆湿地水体中噬藻体为材料, 以*Anabaena* PCC7120为宿主, 通过采用双层平板和液体富集相结合方法分离可培养的噬藻体, 连续富集3代后提取可培养噬藻体的DNA, 采用PCR-克隆测序方法确定可培养的噬藻体的基因系统进化地位, 为将来研究噬藻体基因多样性研究提供数据支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 样品与培养条件:** 大庆湿地水体样品采集于2014年5月1日、6月12日、7月21日、9月4日分别采集于大庆黎明湖(N46°35', E125°07')、万宝湖(N46°35', E125°05')、扎龙湿地(N47°18', E124°25')及林甸稻田(N47°18', E124°37'), 于4 °C冰箱保存。

鱼腥藻*Anabaena* sp. PCC7120由中科院东北地理与农业生态研究所农田分子生态学科组实验室提供。培养基为BG-11培养基, 藻种活化后, 在25 °C, 光照强度约为25  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 光周期为L: D=14 h: 10 h的条件下培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 大庆湿地可培养噬藻体的富集、浓缩:** 将采集到同一地点不同时期的水样按等体积混合均匀, 经0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液作为病毒原液, 接种于生长至对数生长期的*Anabaena* PCC7120蓝藻菌液中, 富集侵染*Anabaena* PCC7120病毒液, 当病毒液变黄, 而未接病毒原液处理仍为蓝绿色时, 采用双层平板法分离水体中噬藻体。即0.5 mL

病毒原液接种与1 mL对数生长期*Anabaena* PCC7120宿主菌悬液混合, 再与5 mL含0.6%琼脂的BG-11半固体培养基混匀, 在无菌条件下倒入已凝固的BG-11固体平板(1.5%琼脂)上层, 静置1 h后, 在25 °C, 光照强度约为25  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 光周期为L: D=14 h: 10 h的条件下培养; 培养5-7 d时, 双层平板呈现噬藻斑, 将噬藻斑琼脂挑入液体BG-11培养基中, 于黑暗条件下静置过夜; 将释放于BG-11的噬藻体病毒液作为病毒源再次进行双层平板分离噬藻体。连续3次双层平板分离获得的噬藻斑, 将带琼脂的噬藻斑全部挑入液体BG-11液体培养基静置过夜, 作为病毒液再次侵染液体*Anabaena*菌悬液, 当宿主颜色变黄, 而对照组仍为蓝绿色时, 浓缩噬藻体病毒液。即将富集得到病毒液中加入12%的氯仿, 涡旋5 min, 静置1 h, 取上清, 上清过0.22  $\mu\text{m}$ 的滤膜, 滤液中加入PEG6000和NaCl到终浓度为10%和0.6%, 混匀, 4 °C黑暗静置24 h后, 13000 r/min离心30 min, 弃上清, 用300  $\mu\text{L}$  SM缓冲液[0.1 mol/L NaCl, 8 mmol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mmol/L Tris-HCl, 0.005%甘油(W/V) pH 7.0]悬浮沉淀, 加入100  $\mu\text{L}$  1 mol/L KCl。冰浴30 min, 离心后, 取上清(约400  $\mu\text{L}$ )即为病毒浓缩液。

**1.2.2 DNA的提取:** 提取病毒液的DNA: 取400  $\mu\text{L}$  病毒浓缩液于1.5 mL离心管中, 加入粗制的DNase和RNase, 使其终浓度均为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 室温放置裂解30-60 min, 8000 r/min离心5 min, 上清转入新的1.5 mL离心管中, 加入蛋白酶和SDS, 使其终浓度分别为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.5%, 56 °C水浴裂解2 h, 8000 r/min离心5 min, 上清转入新的1.5 mL离心管, 加入等体积PCI, 颠倒均匀, 8000 r/min离心5 min, 上清转入新的离心管中, 加入冰异戊醇, -20 °C沉淀30 min, 14000 r/min离心20 min, 用70%乙醇洗涤2次, 干燥后, 用30  $\mu\text{L}$  TE buffer溶解DNA于-20 °C保存。

**1.2.3 *g20*和*pol*基因PCR扩增、克隆测序：**噬藻体2个相关基因PCR扩增体系均为50  $\mu$ L, 其中包括 *Taq*酶buffer 5  $\mu$ L, dNTPs 5  $\mu$ L, primer-F (50 pmol/L) 0.5  $\mu$ L, primer-R (50 pmol/L) 0.5  $\mu$ L, *Taq*酶 (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu$ L, Template 1  $\mu$ L。 *g20*基因引物<sup>[12]</sup>为: CPS1.1 (5'-GTAGWATWTTYTA YATTGAYGTWGG-3')和CPS8.1 (5'-ARTAY TTDCCDAYRWAAGGWTG-3'), 其PCR反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 15 s, 35  $^{\circ}$ C 1 min, ramping 0.3  $^{\circ}$ C/s, 73  $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 73  $^{\circ}$ C 4 min。 *pol*基因引物<sup>[9]</sup>为: CP-DNAP-349F (5'-CCAAAYCTYGCMCARGT-3')和CP-DNAP-533Ra (5'-CTCGTCRTGSACRAASGC-3')、CP-DNAP-533Rb (5'-CTCGTCRTGDATRAASGC-3'), 下游引物1: 1混合后使用, 其PCR反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 每个循环降低1  $^{\circ}$ C, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 10个循环; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 45  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 26个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。将PCR扩增获得的产物经胶回收试剂盒(Bio Gel Extraction Kit, BioFlux, 北京)回收目的片段, 将获得的DNA片段连接至pEASY T1载体上, 转化至大肠

杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 中, 经PCR检测阳性克隆, 通过酶切方法将不同阳性克隆分型, 得到不同的阳性克隆送至测序公司测序。

**1.2.4 系统发育分析：**测序获得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。各基因最近亲缘序列经NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上在氨基酸水平上BLASTp比对获得。本研究所获得的*g20*序列和*pol*序列均与已发表的海洋、湖泊及稻田环境中克隆及分离获得的噬藻体基因在氨基酸水平上构建系统进化树。本研究获得的*g20*序列和*pol*序列已提交至NCBI数据库中, 其登陆号为KT283233-KT283237。

## 2 结果和分析

### 2.1 大庆湿地水样中可培养噬藻体的富集

供试4个大庆湿地水样中噬藻体通过液体富集和双层平板分离观察见图1, 黎明湖水体(图1-A)、林甸稻田水体(图1-B)、万宝湖水体(图1-C)和扎龙湿地(图1-D)等样点均得到噬藻体斑, 且得到的噬

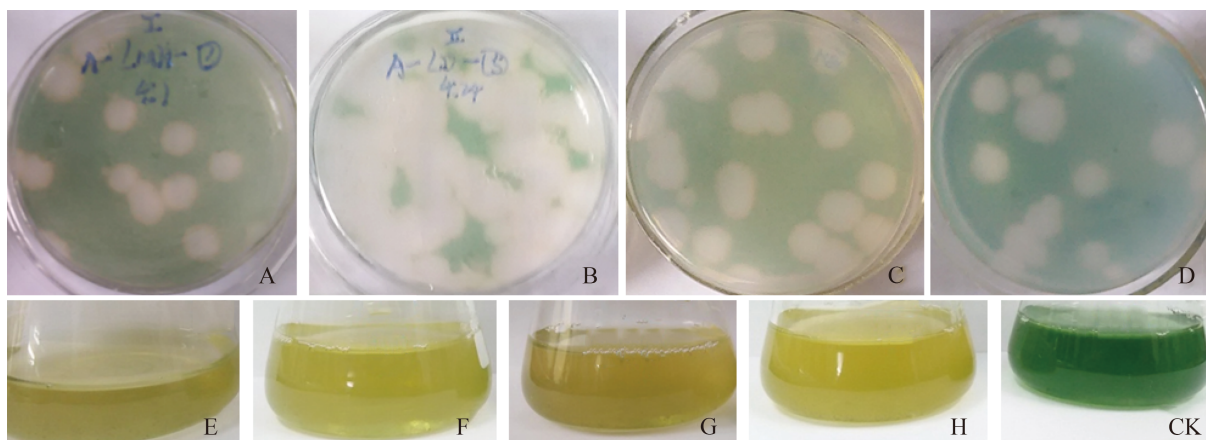


图1. 大庆湿地噬藻体双层平板与液体富集

Figure 1. Double-layer plate of cyanophage and liquid enrichment of cyanophages in Daqing Wetland. A-D indicate the cyanophage plaque from Liming Lake, Lindian paddy floodwater, Wanbao Lake and Zhalong Wetland water, respectively. E-H indicates enrichment liquid of cultured cyanophage from Liming Lake, Lindian paddy floodwater, Wanbao Lake and Zhalong Wetland water, respectively. CK indicates that control with *Anabaena* PCC7120 without cyanophage.

藻斑均为中央透明, 噬藻斑边缘模糊, 未发现有同心圆噬藻斑现象<sup>[3]</sup>。经过3次双层平板分离可培养噬藻体后, 从噬藻斑琼脂中释放出的噬藻体再次侵染液体*Anabaena* PCC7120菌悬液, 各采样点均可变黄, 但颜色存在一些差异, 有些是浅黄色(如林甸样品)、有些为土黄色(如万宝湖样品)。

## 2.2 大庆湿地水样中噬藻体g20和pol基因的PCR扩增、胶纯化、克隆及酶切分析

大庆湿地水样中获得可培养噬藻体并提取其DNA, PCR扩增g20和pol基因, 黎明湖的g20基

因、万宝湖、林甸稻田水体和黎明湖的pol基因均得到一些非特异性条带(图2-A), 而目的条带的位置均在600 bp左右, 将600 bp位置的条带切取进行胶纯化, 得到不同亮度的条带(图2-B), 其中林甸稻田水体中pol基因最亮, 而其他样品条带均可见。各处理的胶纯化得到的DNA片段经克隆得到阳性克隆, 其PCR检测(图2-C), 阳性克隆处于不同位置, 选取600 bp位置的阳性克隆进行酶切分型(图2-D), 将不同分型的阳性克隆送至测序公司测序。

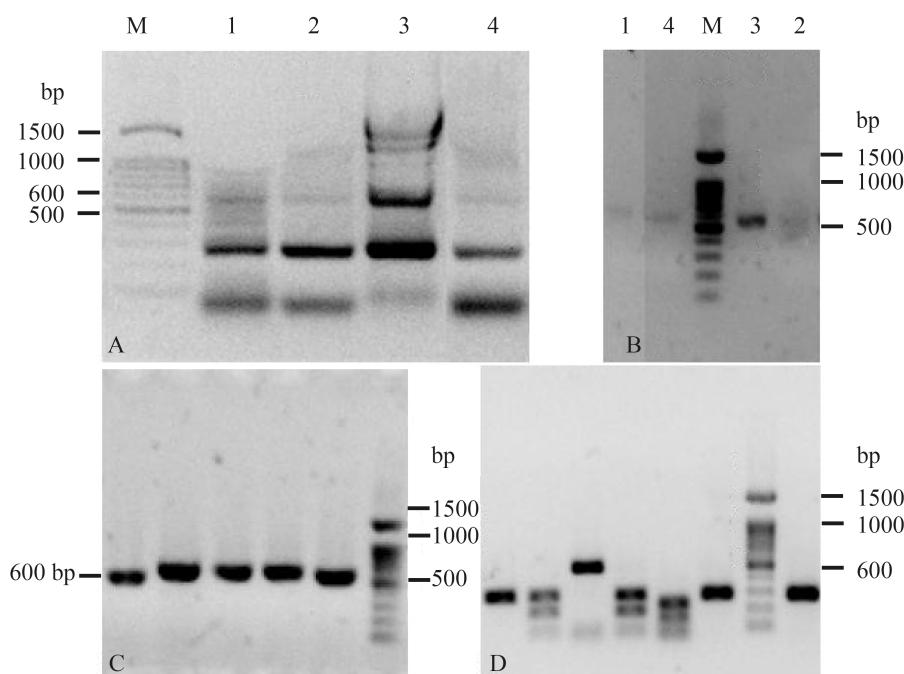


图 2. 大庆湿地水样中噬藻体g20和pol基因的PCR扩增 (A)、胶纯化 (B)、克隆 (C)及酶切图谱 (D)

Figure 2. Profiles of PCR amplification(A), gel purification(B), positive clone(C) and enzyme digestion(D) of g20 and pol gene from cyanophage in Daqing Wetland. lane 1–4 indicate that g20 gene of Lake Liming, pol gene of Lake Wanbao, pol gene of Lindian paddy floodwater and pol gene of Lake Liming, respectively.

## 2.3 大庆湿地水样中噬藻体g20基因的系统进化分析

大庆湿地黎明湖水样中获得有噬藻体g20基因。该基因片段翻译成氨基酸序列得到181个氨基酸残基, 经NCBI网站上BLASTp比对发现, 该基因在氨基酸水平上与法国淡水湖泊中获得的克隆

LAB\_g20\_b26\_C12具有最大相似性(97%) (表1)。

经构建系统发育分析, 见图3-A, 将来自于海洋、湖泊及稻田获得的g20序列与本研究获得的g20序列在氨基酸水平上构建系统发育树, 按王光华等<sup>[13]</sup>划分方法, 将进化树分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 等5个进化簇, 其中本研究获得的g20序列LLM-

表 1. 大庆湿地可培养噬藻体*g20*和*pol*基因BLAST比对结果

Table 1. BLAST results of *g20* and *pol* genes from cultivable cyanophages in Daqing Wetland

Clone names	Length of amino acid	Closest relative	Accession No.	Identity/%	Alignment	Sources	References
LLM-cg20-1	181	LAB_g20_b26_C12	AGN88797	97	175/181	Freshwater	Zhong & Jacquet 2013
LLM-cpol-1	181	PFW-Pol-18	AIC81827	85	154/181	Paddy floodwater	Wang et al. 2014
LLMp-cpol-2	181	PFW-Pol-19	AIC81828	98	177/181	Paddy floodwater	Wang et al. 2014
LDP-cpol-1	178	UTK262-10	ACY35793	75	133/178	South Pacific Ocean	Huang et al. 2010
LWB-cpol-1	181	PFW-Pol-18	AIC81827	84	152/181	Paddy floodwater	Wang et al. 2014

cg20-1分布于Cluster δ中，而Cluster也称为CSP (Cultured *Synechococcus* Phage)进化簇，最早由 Short 和 Suttle命名<sup>[27]</sup>，该进化簇主要包括侵染聚球藻和原绿球藻的可培养噬藻体*g20*基因类群。而本研究经过双层平板连续3次富集侵染*Anabaena*的可培养噬藻体类群，发现其*g20*也归为Cluster δ类群中。

Baker等<sup>[22]</sup>曾报道采用CPS1/CPS2和CPS1/CPS8引物不能扩增AN-15, A-1 (L)和N-1噬藻体的*g20*基因，而本研究所采用的引物CPS1.1/CPS8.1比上述两种引物的简并性更大<sup>[21]</sup>。2013年Ge等<sup>[23]</sup>电镜观察了我国东湖水体中存在着类似于长尾病毒和肌尾病毒的颗粒物，通过PCR扩增也得到了*g20*序列，但经系统进化位置发现这些*g20*基因均未归属于Cluster δ类群中。王光华等<sup>[13]</sup>于2010年采用PCR-克隆的方法在日本稻田水体中也获得9条*g20*序列，分布于CSP-PFW1和CSP-PFW2两个亚进化簇中，他们认为包括聚球藻的其他蓝藻可能是这些*g20*序列的宿主。本研究通过对大庆湿地水体样品中可培养噬藻体进行富集，采用双层平板连续富集可侵染*Anabaena* PCC7120的噬藻体病毒液，以CPS1.1/CPS8.1为引物，首次成功地获得噬藻体*g20*序列，其系统进化地位归属于Cluster δ中。由于本实验采用混合的可培养噬藻体为研究对象，仍无法明确噬藻体所含基因与对应纯化的噬藻体的对应关系，需将纯化噬藻体进行电镜观察和全基因组分析可进一步明确*g20*基因与噬藻体的对应关系。

2.4 大庆湿地水体中噬藻体*pol*基因的系统进化分析

大庆湿地中黎明湖、林甸稻田水体和万宝湖中均有可培养噬藻体的*pol*基因。该基因片段翻译成氨基酸序列得到178或181个氨基酸残基，经NCBI网站上BLAST比对发现，该基因在氨基酸水平上与中国吉林大安稻田水体中获得克隆PFW-Pol-18 (84%–85%)、PFW-Pol-19 (98%) 及来自南太平洋水体中克隆UTK262-10 (75%)具有最高相似性(表1)。将来自于海洋、湖泊及稻田获得的*pol*序列与本研究获得的*pol*序列在氨基酸水平上构建系统发育树(图3-B)，按Chen等<sup>[9]</sup>划分方法，本研究获得的*pol*序列未分布在Cluster I-X中，其中来自黎明湖水体中*pol*克隆LLM-cpol-2分布在PG-Pol-I中，而克隆LLM-cpol-1和LWB-cpol-1与PG-Pol-II更相近，来自林甸稻田水体的克隆LLD-cpol-1形成一个独立的进化分枝。可能在大庆林甸水体存在着新的噬藻体*pol*基因类群。2014年王光华等<sup>[19]</sup>报道在我国吉林省大安稻田水体中存在新的噬藻体*pol*基因类群，并形成特有的2个进化簇PG-Pol-I和PG-Pol-II。本研究通过双层平板法，得到侵染*Anabaena* PCC7120可培养噬藻体混合液，首次成功获得大庆湿地水体中可培养噬藻体的*pol*基因。据报道，稻田生态系统中以念珠藻和鱼腥藻为主要的蓝藻类群<sup>[28]</sup>，笔者推测侵染鱼腥藻的可培养噬藻体类群可能更为丰富，有待深入研究。

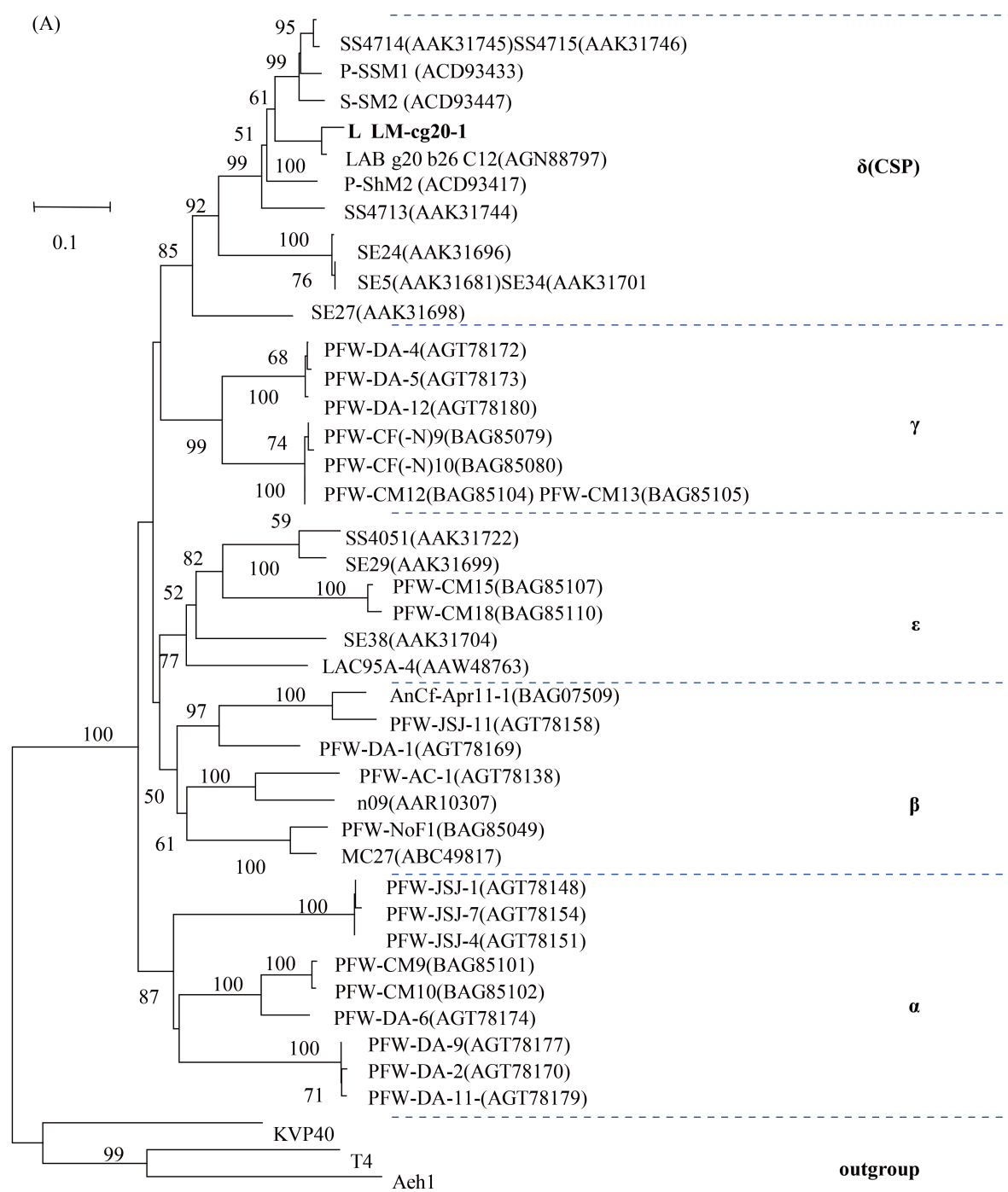


图 3. 大庆湿地可培养噬藻体 *g20* (A) 和 *pol* (B) 氨基酸序列与海洋、湖泊及稻田中 *g20* 和 *pol* 构建的系统进化树

Figure 3. Neighbor-joining phylogenetic trees of *g20* (A) and *pol* (B) from cultivable cyanophages in Daqing wetland with those from marine, lake and paddy field. The number in parentheses denotes the accession number of amino acid sequences in the NCBI website. Bootstrap values <50 are not shown. The scale bar represents the number of amino acid substitutions per residue.

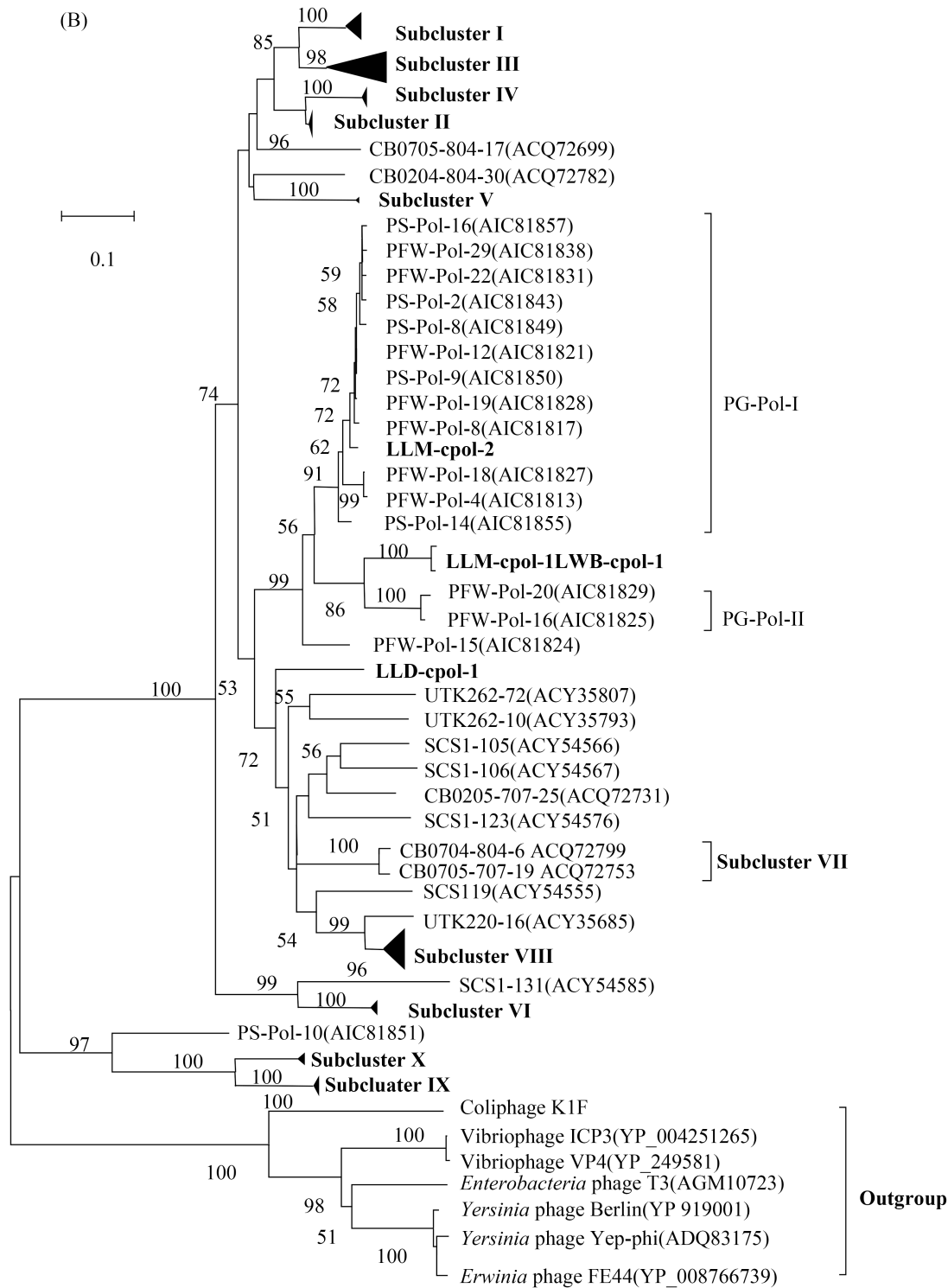


Figure 3. Continued.

### 3 结论和讨论

噬藻体是侵染蓝藻的细菌病毒，广泛分布自

然环境中。病毒多样性是目前微生物生态学研究  
的热点之一。利用病毒某些家族中存在保守氨基  
酸序列设计简并性引物研究病毒多样性已开展了



大量工作,而在淡水可培养噬藻体家族某些基因的系统进化地位有待明确。为此,本研究采用双层平板法,连续3次侵染*Anabaena* PCC7120来富集可培养噬藻体,将可培养噬藻体病毒混合液提取DNA,PCR扩增噬藻体 $g20$ 、 $pol$ 和 $psbA$ 基因,经克隆测序得到1条 $g20$ 序列,4条 $pol$ 序列,未获得 $psbA$ 基因。系统进化分析表明,侵染鱼腥藻的肌尾噬藻体 $g20$ 基因可归属于Cluster  $\delta$ 中,大庆湿地T7型可培养短尾病毒与我国吉林大安稻田水体中噬藻体的亲缘关系相近。以上结果为明确可培养噬藻体相关基因的系统进化地位提供数据支持。

噬藻体的分离过程需要在人工环境条件下提供适宜病毒侵染蓝藻的条件,而有研究报道在噬藻体侵染宿主过程中随着双层平板连续纯化,噬藻体的侵染能力逐渐下降,导致获得可培养的噬藻体相对较难<sup>[7]</sup>。目前,据笔者查阅资料,淡水系统中仍未获得可侵染宿主的*Anabaena* PCC7120的肌尾病毒 $g20$ 基因。1998年Fuller等<sup>[8]</sup>基于 $g20$ 基因编码的保守氨基酸序列首次设计简并性引物可调查环境中的肌尾噬藻体的丰度,Zhong等<sup>[11]</sup>于2002年采用CPS1/CPS8引物成功分析其系统进化地位,之后开展了大量研究,并发现Cluster  $\delta$  (亦称为Cultured *Synechococcus* phage, CSP)来自于可培养的噬藻体类群<sup>[27]</sup>。2008年Deng和Hayes报道<sup>[24]</sup>分离一些侵染*Anabaena*、*Microcystis*和*Planktothrix*噬藻体病毒株35株,仅有1株可侵染*Planktothrix*的P-Z1采用CPS1和CPS2引物扩增获得 $g20$ 基因。由于该对引物扩增片段较小(165 bp),无法对其进行系统进化位置分析。2009年Gao等<sup>[29]</sup>首次分离来自淡水湖泊中可侵染丝状蓝藻*Planktothrix*的病毒株PaV-LD,2012年Gao等<sup>[30]</sup>对PaV-LD全基因组进行测序,发现该噬藻体的 $g20$ 基因与环境样品得到 $g20$ 序列的亲缘性很远。为调查大庆湿地可培养噬藻体相关基因的系统进化地位,本研究未采用分离纯化噬藻体的方法,而是采用连续富集侵染*Anabaena* PCC7120宿主的可培

养噬藻体混合物,提取DNA来研究它们的进化地位,研究发现大庆湿地水体中侵染*Anabaena*宿主的噬藻体类群中 $g20$ 基因也有归属于这个类群。据笔者了解,这是首次发现侵染*Anabaena*噬藻体 $g20$ 基因归属于该类群中。

$pol$ 基因是编码T7型噬藻体短尾病毒核苷酸聚合酶,最早于2009年Chen等<sup>[9]</sup>调查了海洋中T7型噬藻体基因多样性,2010年Huang等<sup>[17]</sup>对全球海洋中T7型噬藻体的 $pol$ 基因进行了调查,并发现新的噬藻体基因类群。Dekel-Bird等<sup>[18]</sup>对海洋中可培养噬菌体的 $pol$ 基因进行了系统进化分析,发现两个进化分枝(Clade A和Clade B)。而这些噬藻体的宿主来自于海洋的*Synechococcus*和*Prochlorococcus*。2014年Wang等<sup>[19]</sup>报道通过稻田水体环境DNA,采用PCR-克隆技术在东北稻田水体中发现新的T7型短尾噬藻体 $pol$ 基因类群(PG-Pol-I和PG-Pol-II),而本研究中以*Anabaena* PCC7120为宿主富集获得的T7型噬藻体类群采用PCR克隆测序的方法,它的系统进化归属于来自东北稻田水体中的PG-Pol-I和PG-Pol-II两进化分枝中,另外发现新的短尾噬藻体基因类型。

迄今为止,噬藻体通过电镜观察到总数达到6000株,常见噬藻体主要归属于肌尾病毒(*Myoviridae*)、长尾病毒科(*Siphoviridae*)和短尾病毒科(*Podoviridae*)<sup>[7]</sup>。 $g20$ 基因作为分子标记主要针对肌尾噬藻体病毒类群, $pol$ 基因是T7型短尾病毒科的分子标记,而 $psbA$ 是编码光合反应中心蛋白D1亚基的基因,在肌尾病毒和短尾病毒中均有发现<sup>[31]</sup>。本研究从可培养噬藻体DNA中PCR扩增未获得 $psbA$ 基因条带说明两方面问题,其一,本研究获得的病毒DNA无宿主DNA的污染,其二,可能在可培养噬藻体中 $psbA$ 基因未进行适应性的进化<sup>[32]</sup>。由于某些噬藻体的侵染能力随着纯化次数的增加而下降,本研究无法成功地对可培养噬藻体的纯化与电镜观察,而采用富集可培养的噬藻体类群,可探讨可培养噬藻体的系统进化地位。



后续工作需将噬藻体进行纯化和电镜观察, 解析噬藻体基因组及相关基因的系统地位, 从分子进化的角度可推动病毒生态学发展。

## 致谢

感谢中国科学院东北地理与农业生态研究所王光华研究员提供 *Anabaena* sp. PCC7120 菌株和论文完成过程中提出的宝贵建议。

## 参考文献

- [1] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 69–114.
- [2] Zhao YJ, Chen K, Shi ZL, Guo YX, Zhu HY, Zhang JH, Liu YD. Isolation and identification of the first cyanophage in China. *Progress in Nature Science*, 2002, 12(9): 923–927. (in Chinese)  
赵以军, 程凯, 石正丽, 郭亚新, 祝海燕, 张建红, 刘永定. 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定. *自然科学进展*, 2002, 12(9): 923–927.
- [3] Liao XY, Ou T, Gao H, Xu XD, Zhu R, Zhang QY. Main reason for concentric rings plaque formation of virus infecting cyanobacteria (A-4L) in lawns of *Anabaena variabilis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(2): 191–199. (in Chinese)  
廖湘勇, 欧铜, 高宏, 徐旭东, 朱蓉, 张奇亚. 蓝细菌病毒A-4L在鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)藻苔中形成的同圆心圆噬斑的成因. *微生物学报*, 2014, 54(2): 191–199.
- [4] Liu L, Guo ZL, Huang P, Wang H, Xu LH. Isolation and identification of a cyanophage in Lake Taihu. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(2): 339–343. (in Chinese)  
刘露, 郭宗楼, 黄朴, 王昊, 徐立红. 一株太湖水域蓝藻噬藻体的分离与鉴定. *水生生物学报*, 2012, 36(2): 339–343.
- [5] Gao EB, Li SH, Lv B, Zhang QY. Analysis of the cyanophage (PAV-LD) infection in host cyanobacteria under different culture conditions. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(3): 420–425. (in Chinese)  
高恶斌, 李三华, 吕波, 张奇亚. 水华蓝藻噬藻体对不同条件培养的宿主细胞感染性分析. *水生生物学报*, 2012, 36(3): 420–425.
- [6] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 2007, 152(2): 227–243.
- [7] Zhang QY. Advances in studies on biodiversity of cyanophages. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 545–559. (in Chinese)  
张奇亚. 噬藻体生物多样性的研究动态. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 545–559.
- [8] 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(6): 2501–2060.
- [9] Chen F, Wang K, Huang SJ, Cai HY, Zhao MR, Jiao NZ, Wommack KE. Diverse and dynamic populations of cyanobacterial podoviruses in the Chesapeake Bay unveiled through DNA polymerase gene sequences. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(11): 2884–2892.
- [10] Mann NH, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M. Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*, 2003, 424(6950): 741.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Wang GH, 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.
- [14] 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.
- [15] Yan Q, Wang M, Bai X, Sun J, Liang YT, 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.

- [16] Jing RY, Liu JJ, Yu ZH, Liu XB, Wang GH. Phylogenetic distribution of the capsid assembly protein gene (*g20*) of cyanophage in paddy floodwaters in Northeast China. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88634.
- [17] Huang SJ, Wilhelm SW, Jiao NZ, Chen F. Ubiquitous cyanobacterial podoviruses in the global oceans unveiled through viral DNA polymerase gene sequences. *The ISME Journal*, 2010, 4(10): 1243–1251.
- [18] Dekel-Bird NP, Avrani S, Sabehi G, Pekarsky I, Marston MF, Kirzner S, Lindell D. Diversity and evolutionary relationships of T7-like *podoviruses* infecting marine cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(5): 1476–1491.
- [19] 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. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 331–334.
- [20] 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.
- [21] Jing RY, Kimura M, Wang GH. Genetic diversity of capsid assembly protein genes (*g20*) of cyanophage in different natural environment- A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1149–1157. (in Chinese)  
荆瑞勇, Kimura M, 王光华. 不同自然环境下噬藻体*g20*基因多样性研究进展. 微生物学报, 2013, 53(11): 1149–1157.
- [22] 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.
- [23] 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. *Virologica Sinica*, 2013, 28(5): 280–290.
- [24] Deng L, Hayes PK. Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 2008, 53(6): 1240–1252.
- [25] Labrie SJ, Frois-Moniz K, Osburne MS, Kelly L, Roggensack SE, Sullivan MB, Gearin G, Zeng Q, Fitzgerald M, Henn MR, Chisholm SW. Genomes of marine cyanopodoviruses reveal multiple origins diversity. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(5): 1356–1376.
- [26] Li SH, Ou T, Zhang QY. Two virus-like particles that cause lytic infections in freshwater cyanobacteria. *Virologica Sinica*, 2013, 28(5): 303–305.
- [27] 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.
- [28] Prasanna R, Jaiswal P, Nayak S, Sood A, Kaushik BD. Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian Journal of Microbiology*, 2009, 49(1): 89–97.
- [29] Gao EB, Yuan XP, Li RH, Zhang QY. Isolation of a novel cyanophage infectious to the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Cyanophyceae) from Lake Donghu, China. *Aquatic Microbial Ecology*, 2009, 54(2): 163–170.
- [30] Gao EB, Gui JF, Zhang QY. A novel cyanophage with cyanobacterial nonbleaching protein a gene in the genome. *Journal of Virology*, 2011, 86(1): 236–245.
- [31] 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): 1344–1357.
- [32] Zeidner G, Bielawski JP, Shmoish M, Scanlan DJ, Sabehi G, Bèjà O. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(10): 1505–1513.

# Isolation and phylogenetic analysis of related genes of cultivable cyanophages in Daqing Wetland

Wei Li, Ruirui Li, Ruiyong Jing<sup>\*</sup>, Haijun Zhang, Pengfei Hu, Liyan Wang

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 cyanophages isolated from Daqing wetland by analyzing their genetic diversity and phylogenetic positions. [Methods] Liquid enrichment culture and double-layer plate methods were used to isolate cultivable cyanophages by using host cyanobacteria *Anabaena* PCC7120, and the DNA of cultivable cyanophages was extracted. The biomarker genes of *g20* encoding capsid assembly protein and *pol* encoding DNA polymerase in *podoviruses* were PCR amplified. The PCR products were cloned and sequenced. The sequences were constructed with references sequences into the phylogenetic trees to clarify the phylogenetic positions of cultivable cyanophage. [Results] One *g20* sequence and four *pol* sequences were obtained. Phylogenetic analysis showed that the *g20* sequence belongs to the cultivable cyanophage group (Cluster  $\delta$ ). Three *pol* sequences were closely related to cyanophage groups PG-Pol-I and PG-Pol-II that were observed in an alkaline paddy floodwater in Da'an, Jilin province, China; another *pol* sequence formed a unique clade. [Conclusion] The *g20* gene from cultivable cyanophages infecting *Anabaena* PCC7120 belongs to the Cluster  $\delta$ , and the *pol* genes are closely related to those of paddy floodwater in Da'an, China.

**Keywords:** Daqing Wetland, cultivable cyanophage, *Anabaena*, phylogenetic analysis

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the Project of Undergraduate Innovation and Entrepreneurship (201410223024), by the Fund of Doctor Start-up (XDB2015-19) and by the National Natural Science Foundation of China (31300425)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-459-6819299-810; E-mail: jry\_2002@126.com

Received: 17 July 2015; Revised: 2 September 2015; Published online: 9 December 2015