

基于多位点序列分型方法的于桥水库微囊藻遗传多样性分析

郑涛 曹琪 朱梅 乔之怡

GENETIC DIVERSITY OF *MICROCYSTIS* STRAINS IN YUQIAO RESERVOIR BASED ON MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) APPROACH

ZHENG Tao, CAO Qi, ZHU Mei, QIAO Zhi-Yi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.067>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[gvpA-C间隔区在微囊藻株系分型中的应用](#)

APPLICATION OF THE *GVPA-C* INTERGENIC SEQUENCE IN TYPING OF *MICROCYSTIS*

水生生物学报. 2019, 43(5): 1098–1103 <https://doi.org/10.7541/2019.129>

[基于线粒体CO I 基因和控制区序列的辽宁沿海弯棘斜棘群体遗传多样性和遗传结构分析](#)

POPULATION GENETIC STRUCTURE AND DIVERSITY ANALYSIS OF *REPOMUCENUS CURVICORNIS* IN THE LIAONING COAST BASED ON DNA SEQUENCES OF THE MITOCHONDRIAL *CO I* GENE AND CONTROL REGION

水生生物学报. 2017, 41(3): 581–588 <https://doi.org/10.7541/2017.75>

[基于线粒体CO I 基因序列的东南沿海可口革囊星虫遗传多样性分析](#)

THE GENETIC DIVERSITY OF *PHASCOLOSOMA ESCULENTA* IN THE COASTAL ZONE OF SOUTH-EASTERN CHINA BASED ON SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL *CO I* GENE

水生生物学报. 2017, 41(6): 1257–1264 <https://doi.org/10.7541/2017.156>

[基于线粒体CO I 序列的南海北部栉江珧遗传多样性分析](#)

GENETIC DIVERSITY OF *ATRINA PECTINATA* FROM THE NORTHERN SOUTH CHINA SEA BASED ON MITOCHONDRIAL DNA *CO I* SEQUENCE

水生生物学报. 2019, 43(3): 494–503 <https://doi.org/10.7541/2019.061>

[鱼源无乳链球菌的血清型及分子分型研究](#)

SEROTYPES AND MOLECULAR TYPING OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* ISOLATED FROM FISH

水生生物学报. 2017, 41(4): 800–806 <https://doi.org/10.7541/2017.100>

[基于SNP标记的短须裂腹鱼自然群体遗传多样性分析](#)

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF NATURAL POPULATION OF *SCHIZOTHORAX WANGCHIACHII* BASED ON SNP MARKERS

水生生物学报. 2018, 42(2): 271–276 <https://doi.org/10.7541/2018.034>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.067

基于多位点序列分型方法的于桥水库微囊藻遗传多样性分析

郑涛 曹琪 朱梅 乔之怡

(天津农学院水产学院, 天津市水产生态与养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要: 为了研究天津于桥水库微囊藻(*Microcystis*)的遗传多样性及其系统发育关系, 将分离自于桥水库的10株微囊藻的7个管家基因(*ftsZ*、*glnA*、*gltX*、*gyrB*、*pgi*、*recA*和*tpi*)构建了微囊藻的多位点序列分型(MLST)基因库, 与20个鄱阳湖序列型(STs)和237个日本湖泊的序列型进行比对, 结果发现于桥水库的STs呈独立分支, 说明相对于其他地区的藻株, 于桥水库微囊藻株具有共同祖先。MLST的结果显示本研究10个藻株具有较高的遗传多样性, 平均期望杂合度 H 值为0.938。基于序列类型构建的系统发育树显示, MLST可以有更精细的分辨率, 有成为种群分子标记的潜在可能性。

关键词: 遗传多样性; 多位点序列分型; 种群分子标记; 微囊藻; 于桥水库

中图分类号: Q145⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)04-0871-10



随着全球水体富营养化水平的逐渐提高, 由于藻类大量繁殖造成的蓝藻水华问题成为淡水生态系统的共同威胁。全世界大约85%的淡水蓝藻水华由微囊藻占优势^[1], 而且还有加重的趋势, 因为近年来的全球变暖可能会加剧不同水域中微囊藻暴发的频率、持续时间和泛滥程度^[2]。

目前, 世界上已发现的微囊藻共有50多种。传统形态学分类根据微囊藻的群体形态、群体外胶被特征、细胞排列方式和气囊特点等来分种。然而, 在不同条件下微囊藻的群体形态可能会有很大变化^[3], 这种现象使微囊藻的分类变得困难, 因此, 也有学者认为现有微囊藻仅存一种, 即将铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、挪氏微囊藻(*Microcystis novacekii*)、鱼害微囊藻(*Microcystis ichthyoblabe*)、绿色微囊藻(*Microcystis viridis*)和惠氏微囊藻(*Microcystis wesenbergii*)统称为铜绿微囊藻^[4]。微囊藻可产生多种有害次生代谢物, 其中最为常见的微囊藻毒素(MCs), 可对肝、肠、脑、肾、肺、心和生殖系统造成不可逆损伤^[5, 6]。微囊藻形态多变, 仅靠形态难以对有毒无毒藻株进行区分。也正由于微囊藻的广泛分布和其带来危害的严重性, 微囊藻的遗传特性得到了广泛的研究^[7, 8]。

诸多证据表明地理隔离是微生物遗传分化的重要力量^[9-11]。一般认为水系隔离较强就有更高的遗传多样性, 但是Zhu等^[12]应用ITS作为遗传标记发现, 在对一个孤立的和超富营养化池塘进行的连续监测中, 微囊藻种群内具有较高的遗传多样性。Huo等^[7]应用高通量测序的方法也在中国北方某水库中发现微囊藻的多样性极高, 这一结果证实了同一水系中微囊藻的多样性也会有所不同。所以利用多样性较高的分子遗传标记广泛对各水系进行研究, 才有可能较清楚的解释微囊藻变异与地理因素的关系, 可是相关研究较少报道, 所以地理因素对微囊藻遗传多样性的影响变得更加深远复杂^[13]。这需要用更合适的方式进一步评估微囊藻种群之间相似性及分析遗传多样性形成中进化力量的作用。

采用高通量测序方法研究微囊藻的遗传多样性与环境因素之间的关系已被证明是可靠的^[7]。这种方法可以获取较多的信息, 但数据分析工作专业性强, 消耗时间长, 难以在短时间进行种群结构和多样性研究。单基因序列多样性分析技术也被应用于微囊藻上, 研究发现重组能在很大程度上促进微囊藻的自然遗传多样性, 并强调了基因交换对微囊藻种群遗传结构的潜在重要性^[14], 如常用的序

收稿日期: 2020-04-10; 修订日期: 2020-07-19

基金项目: 天津市科技重大专项与工程(18ZXSZSF00080)资助 [Supported by the Science and Technology Major Project of Tianjin (18ZXSZSF00080)]

作者简介: 郑涛(1994—), 男, 硕士研究生; 研究方向为蓝藻生态学。E-mail: weiqiuxuanri@126.com

通信作者: 乔之怡, 女, 副教授; E-mail: zhiyiqiao@tjau.edu.cn

列有ITS^[15]和*cpcBA*-IGS^[16]等。目前,与全基因组测序一样,多位点序列分型的方法常被用在对地理距离较远的种群中,以充分评价地理因素在微囊藻精细遗传结构发育中的作用,其中管家基因已被证明是有效的遗传标记,这也使推断出决定和限制微囊藻种内遗传多样性的其他进化因素成为可能^[17, 18]。

多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)是近年来分子生物学研究中发展较快的方法之一。MLST技术最初是在1998年为脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)研发的,目的是解决不同实验室之间的分子分类重复率低的问题^[19]。MLST一般检测6—10个管家基因中400—600 bp的核苷酸序列。每个位点的序列根据被发现的时间分配一个等位基因数,每个菌株的等位基因数按指定的顺序排列为其等位谱,即菌株的序列类型(Sequence type, ST)。因此,每个ST代表一组核苷酸序列信息。通过比较ST,可以发现菌株之间的相关性,即亲缘关系较近的菌株有相同的ST,或者只有少数不同的ST基因位点,而亲缘关系较远的菌株则至少有3个或3个以上不同的ST基因位点。由于其高分辨率,在国际菌株研究中经常被用来确定流行病菌抗原的来源^[20]。大量研究表明,MLST是一种介于在单基因和全基因组测序之间有足够的遗传信息且较为简便快速的分析方法^[21, 22]。目前缺乏更精细的微囊藻种内的分类依据,从DNA分子多样性有可能筛选到合适的分类标记,MLST可以有更精细的分辨率,有成为分类分子标记的潜在可能性。但目前为止,仅有少数学者将MLST应用于蓝藻遗传多样性的研究,同时在他们的研究中提出应用MLST研究微囊藻应建立更加丰富的数据库^[17, 18]。

于桥水库曾是天津唯一的饮用水源地。近年来,微囊藻在夏季的库中占绝对优势且组成复杂^[23]。研究其种群结构具有对微囊藻藻华的发生进行监测和控制等特殊的生态意义^[7]。虽然之前于桥的研究已经包括了水库的水化指标^[24, 25]、蓝藻生态模型建立^[26]和其他内容。但这些研究都是基于传统的计数和理化指标的测定,而微囊藻群体形态特征高度可变,甚至有学者对微囊藻属种水平的分类提出异议^[1]。

本研究利用多位点序列分型分析技术对天津于桥水库的10株微囊藻株的7个管家基因进行分析,并与20个鄱阳湖序列型和237个日本湖泊序列型(STs)进行比较,在研究我国北方水库型水体中微囊藻的基因型组成变化和遗传多样性的基础上,进一步探究地理隔离与种内进化在与微囊藻MLST多样性的关系。

1 材料与方法

1.1 微囊藻藻株的分离和培养

2018年7月20日分别在于桥水库的放水洞、库中、库东、库西、库南、库北和峰山7个站位取样50 mL等比例混合后,24h内带回实验室用经典毛细管法,在灭菌CT^[27]培养基中单克隆培养微囊藻藻株,培养温度25℃,光照强度25 $\mu\text{mol photons}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$,昼夜比12h:12h。微囊藻藻株纯化后移至含有无菌CT培养基的5 mL玻璃试管中。

1.2 16S rDNA、*cpcBA*和*mcyE*基因的检测

毒素基因的检测采用*mcyE*片段,退火温度为55℃,其余条件与管家基因相同^[18]。16S rDNA基因PCR程序为:94℃预变性5min,94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸1min 30s,此3个过程为30个循环,最后72℃终延伸5min。*cpcBA*基因PCR程序为:94℃预变性2min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,此3个过程为35个循环,最后72℃终延伸5min。基因检测的引物序列如表1所示。

1.3 MLST基因的检测

表1显示本研究使用的7个MLST管家基因,包括*ftsZ*、*glnA*、*gltX*、*gyrB*、*pgi*、*recA*和*tpi*^[17, 18]。每个基因座都为单拷贝形式存在,使用全细胞PCR对目的片段进行扩增。PCR扩增体系在柳满森等^[17]的实验基础上做出改变,将总体积改为25 μL ,反应条件为:94℃预变性3min,94℃变性60s,60℃退火30s,72℃延伸30s,此3个过程为35个循环,最后72℃延伸5min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,然后经TIANquick Maxi Purification Kit (Tiangen)纯化DNA,并用pEASY-T1 cloning kits (TransGen)回收,之后挑取单克隆进行测序,利用NCBI下载相关基因序列,构建局部基因库。MLST对每个位点及不同的等位基因都分配了一个随机数,7个等位基因的唯一组合明确定义了一个藻株类型序列(ST)。

1.4 七个管家基因的重组分析

从GenBank中选取*Microcystis* PCC 7806作为参考亲本株系。使用Sim Plot 3.5进行潜在重组事件的相似性检测^[28],窗口长度为20 bp,每步为20 bp。将统计数据导出后,在Excel中对数据进行作图分析。

1.5 种群遗传和系统发育分析

采用DnAsp^[29]分析DNA遗传多样性指数,具体计算公式如下: $H = \left[\left(\frac{n}{n-1} \right) \right] (1 - \sum p_i^2)$,基于Tajima's *D*和Fu and Li's *D*^[30]检验核苷多样性。系

统发育分析采用Fasconcat-g软件, 按照*ftsZ-glnA-gltX-gyrB-pgi-recA-tpi*的序列顺序连接7个管家基因, 然后在MEGA X软件中对连接顺序进行对齐, 使用jModeltest对模型进行推断, 计算参数。用IQ-TREE建立最大似然树。

2 结果

2.1 基于MLST的序列差异和系统分析

本研究从10株微囊藻中分别扩增得到了7个MLST基因片段, 将本实验得到的MLST测序结果与前文提到的构建的MLST本地基因库进行比较, 得到10个新的ST型(ST258-ST267)。如表2所示, 每个ST对应唯一的微囊藻藻株。

2.2 *mcyE*基因检测及16S rDNA和*cpcBA*基因的系统分析

本研究藻株的*mcyE*基因检测结果均为阴性, 说明它们产出微囊藻毒素的几率较低。分别将得到的10株微囊藻的16S rDNA基因和*cpcBA*基因片段添加进GenBank数据库中, 构建系统发育树(图1)。2个系统发育树的拓扑结构均显示本研究的10株藻株均位于微囊藻属的分支上, 证明它们均为微囊藻属。图1A为16S rDNA系统发育树, 将

10株藻分为3组, TJAU1单独一组, TJAU2、3、5、9、10聚在一起, 同时TJAU4、6、7、8聚在一起; 在图1B中, 除藻株TJAU8外, 其他9藻株紧密聚集在一起。

2.3 基因重组分析

以标准微囊藻株PCC 7806作为参考株系, 使用Simplot重组分析工具对得到的7组MLST基因片段进行了基因重组分析, 如图2所示: *ftsZ*的序列相似性达到100%, *recA*的序列相似性则多在95%以上, 且突变频率均匀, 说明*ftsZ*与*recA*序列不存在重组的可能。*glnA*、*gltX*、*gyrB*、*pgi*与*tpi*序列检测显示, 序列相似性多在95%以下且检测到不同程度的重组信号。

2.4 基因多样性

在删除MLST序列两端的多余序列后, 在任何位点的序列中都没有发现插入或删除, 因此可以对序列进行对齐。DNAsp软件计算的遗传多样性指数如表3所示。本研究从10株藻中获得了10个STs。等位基因的数量从*gyrB*的14个到*pgi*的39个不等。总核苷酸多样性平均值为1.883%, 其中*gltX*最高为2.616%, *tpi*最低为1.106%。本试验所测于桥水库的MLST基因片段长度在409—451 bp, 平

表1 分别用于MLST和*mcyE*基因、16S rDNA基因和*cpcBA*基因的PCR引物序列

Tab. 1 PCR primer sequence used in MLST and PCR primer sequence of *mcyE* gene, 16S rRNA gene and *cpcBA* gene

位点Locus	基因产物 Gene product	引物 Primers	序列 Sequence (5'—3')	序列长度 Length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>ftsZ</i>	细胞分裂蛋白 FtsZ cell division protein <i>FtsZ</i>	<i>ftsF</i> <i>ftsR</i>	GGTTTACAAAGTCGGGTCGATAC CCTGCATTTTCTCGTCAATTAC	409	60
<i>glnA</i>	谷氨酰氨合成酶 Glutamine synthetase	<i>glnF</i> <i>glnR</i>	AACCCACCCCTAAGCATGATCTG GCCACGTTCTTGATGCAGTA	451	60
<i>gltX</i>	谷氨酰tRNA合成酶 Glutamyl-tRNA synthetase	<i>gltF</i> <i>gltR</i>	ATTCAAGCGGGCCTACAATG TCCCCACGAATAACATGGGTAAT	430	60
<i>gyrB</i>	DNA旋转酶亚基B DNA gyrase subunit B	<i>gyrF</i> <i>gyrR</i>	GGACGTTTACGAGAACTAGCCTA GGTCTTGTTTGTCCCTCAA	416	60
<i>pgi</i>	葡萄糖-6-磷酸异构酶 Glucose-6-phosphate isomerase	<i>pgiF</i> <i>pgiR</i>	CGCTCCTGAACCTCGCTCC ATGGGGAAACGAGTTAGCCA	424	60
<i>recA</i>	<i>RecA</i> 重组蛋白 Recombination protein <i>RecA</i>	<i>recF</i> <i>recR</i>	ATGCGGAACACGCTTTAGA AGGAGGCGCGACTTTATTTT	446	60
<i>tpi</i>	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase	<i>tpiF</i> <i>tpiR</i>	GGCTTATACGGGCGAAATCT CCGACTAAAGCCCCGTTTAT	416	60
<i>mcyE</i>	微囊藻毒素E Microcystin E	<i>mcyEF2</i> <i>mcyER4</i>	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC AATTTCTAAAGCCCAAAGACG	810	55
16S rDNA	16S核糖体RNA基因 16S ribosomal RNA gene	27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	1486	54
<i>cpcBA</i> -IGS	藻蓝蛋白操纵子 <i>cpcBA</i> 基因间 间隔物的一部分 A part of the phycocyanin operon <i>cpcBA</i> intergenic spacer	<i>cpcF</i> <i>cpcR</i>	GGCTGCTTGTTTACGCGACA CCAGTACCACCAGCAACTAA	663	55

表 2 于桥水库10株微囊藻的MLST序列及相应的等位基因数目

Tab. 2 MLST sequences and numbers of 10 strains of *Microcystis* from Yuqiao Reservoir

藻株编号 Strain	序列编号 STs	位点Locus						
		<i>ftsZ</i>	<i>glnA</i>	<i>gltX</i>	<i>gyrB</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>	<i>tpi</i>
TJAU004	258	70	129	134	99	112	102	92
TJAU011	259	44	130	6	6	113	103	92
TJAU012	260	20	7	55	100	114	104	93
TJAU014	261	71	131	135	86	115	105	92
TJAU018	262	72	30	136	23	116	27	94
TJAU019	263	47	86	137	94	117	15	95
TJAU028	264	73	132	138	6	118	6	96
TJAU031	265	74	86	139	94	116	106	92
TJAU034	266	20	7	55	101	119	102	97
TJAU053	267	75	133	94	102	33	107	98

均遗传多样性 $H=0.938$, Tajima's D 、Fu、Li's D^* 均未拒绝中性遗传多样性的原假设。

2.5 进化分析

为了缓冲重组对进化结果的影响,将总长度为2992 bp的7个MLST序列串联起来^[31]。采用JModel-test软件进行分层似然比检验和多位点序列进化分析发现,最优模型为GTR + F + G4,四个碱基的频率分别为0.2842、0.2267、0.245和0.2441。替代模型的速率矩阵为 $R(d)[C-G]=1.8512$, $R(e)[C-T]=6.1697$, $R(f)=1.0000$ 。以于桥水库10个STs、鄱阳湖20个STs和日本湖泊237个STs为基础的MLST系统发育树如图3所示。ST1-ST237为日本湖泊的序列类型,ST238-ST257为鄱阳湖的序列类型,ST258-ST267为于桥水库的序列类型。结果表明,藻株之间的亲缘关系得到了很好的解释,系统发育树形成明显分枝,其中于桥水库的微囊藻全部聚集于一个簇。

3 讨论

应用基于7个管家基因的多位点序列分型技术(MLST)对分离自于桥水库的10株微囊藻的序列类型进行分析,结果发现,在所有试验的藻株中未发现完全相同的基因型,与前人关于STs很少同时出现在2个以上的位置的研究结果相似^[17, 18]。这表明了于桥水库微囊藻存在广泛的遗传多样性。

本研究采取无差别随机取样方式获取了10株微囊藻藻株,PCR检测产微囊藻毒素 $mcyE$ 基因,结果均为阴性。由此推测在于桥水库中产毒素藻株总体比例偏低。这与王捷等^[32]在我国北方另一水体,汾河太原区段的研究中提出的微囊藻产毒素能力偏弱是一致的。有研究揭示许多种类的细菌具

有降解微囊藻毒素的能力^[33],微囊藻产毒株的竞争能力在北方水体中可能受到了水温和气候,甚至水体细菌等因素的影响而整体偏弱。

基于分子生物学的微囊藻种群时空分布调查已经成为了解微囊藻群体遗传规律和追踪水华发生过程的常规手段^[34]。统计结果显示,于桥水库微囊藻具有较高的遗传多样性。平均基因多样性 $H=0.938$,略低于鄱阳湖的微囊藻基因多样性($H=0.986$)^[17]和日本湖泊的微囊藻基因多样性($H=0.951$)^[18],但远远高于大肠杆菌($H=0.47$)^[19]和枯草芽孢杆菌的基因多样性($H=0.44$)^[35]。对微囊藻的高遗传多样性的一种解释是基因可能存在重组,通过基因重组,可产生大量的遗传变异,遗传多样性区域的增加与重组率的增加相关^[36]。本研究结果显示7个管家基因中有5个可能发生了重组。另一种对高遗传多样性的解释是,微囊藻包含几个生态上不同的种群或生态型,这与刘满森等^[17]的研究结果相近。考虑到生态分化与遗传分化的关系,一个物种如果有更多的生态型,其遗传多样性就会保持得更高^[11]。从于桥水库中已分离出10种不同的STs,表明于桥水库水体环境条件可能并不稳定^[37, 38],对于微生物来说,四季水环境的波动造成了精细的生态位差异,而水体中共存的微囊藻基因型是环境波动条件下的竞争结果,这与孙千千等^[39]得出的温度是驱动季节演替的主要因素和风引起的迁移是影响微囊藻群落空间分布的重要因素的结果一致。

ML树显示,在大的空间尺度上于桥水库的序列类型聚在一起,这可能是由于于桥水库中藻株种源结构较为一致或是生态上不同的种群经过反复的选择性清除,从而造成基因组中多数基因位点高度一致^[11]。结果还显示,基于16S基因构建的系统发育树中TJAU1与其他8个藻株相距较远。基于 $cpcBA$ 基因构建的系统发育树中TJAU8距离其他9个藻株较远。有证据表明,一些微生物种群可能保持了大量的精细基因型和表型多样性,因此这2株藻可能进化成为不同的基因亚型^[40]。结合中性检验的结果,说明遗传漂变可能是同一位点遗传多样性高的主要原因。虽然基于16S rDNA与 $cpcBA$ 基因构建的进化树都表明本实验所用的10株藻株为微囊藻属,然而,在本实验中 $cpcBA$ 与16S rRNA的拓扑结构并不完全一致,这也表明虽然这些基因相对保守,但系统发育不一致仍然存在,不能排除同源重组增强了微囊藻的种群优势形成^[41]。在基于16S rDNA和 $cpcBA$ 基因的系统发育拓扑结构中,并没有显示出大空间尺度上明显的地理分布格局,这说明地理隔离可能不是影响微囊藻种群遗传的

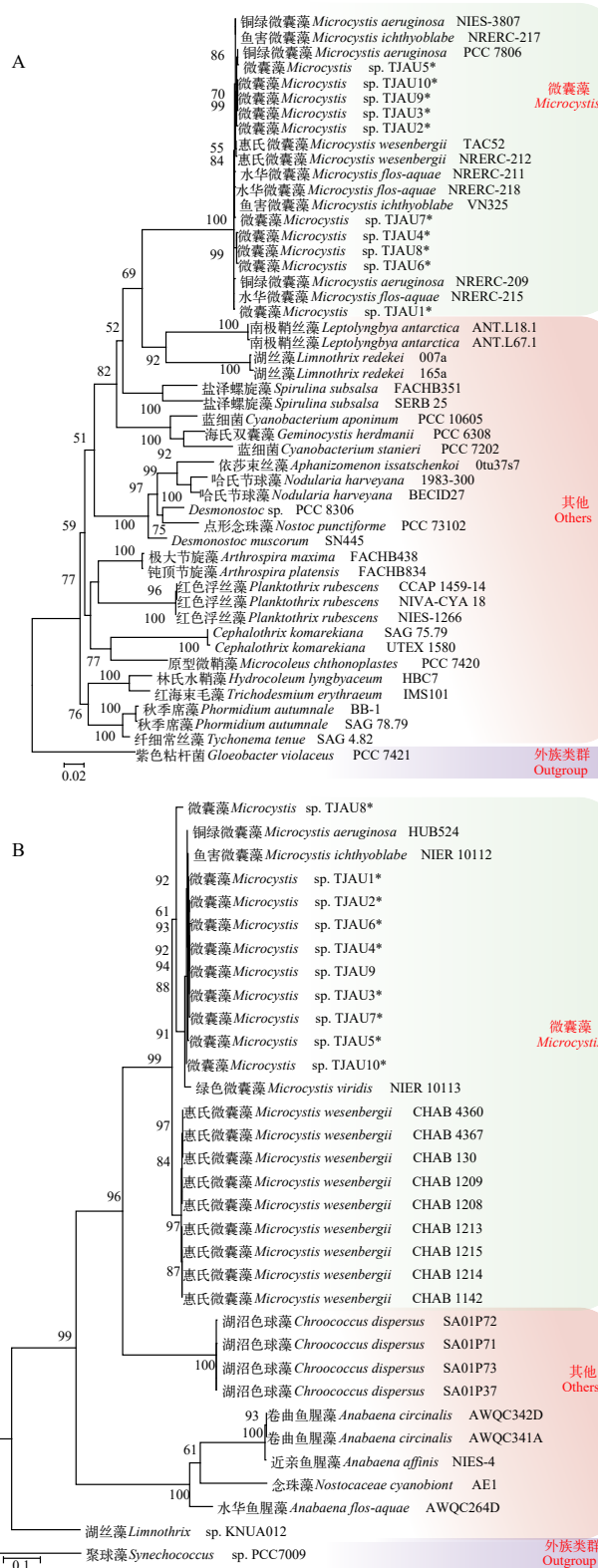


图1 基于蓝藻16S rDNA和cpcBA的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA and cpcBA of Cyanobacteria

A. 基于16S rDNA基因的蓝藻系统发育树; B. 基于cpcBA基因的蓝藻系统发育树。使用极大似然算法计算树, 重复次数为1000代, 在节点处给出自展值。从于桥水库中分离出的微囊藻的序列, 在树上添加了*

A. Phylogenetic tree of *Cyanobacteria* based on 16S rDNA; B. Phylogenetic tree of *Cyanobacteria* constructed based on cpcBA gene. The maximum likelihood algorithm is used to calculate the tree, number of bootstrap is 1000, and the boot value is given at the node. *Microcystis* isolated from Yuqiao Reservoir, which is included in the current system, was added * on the tree

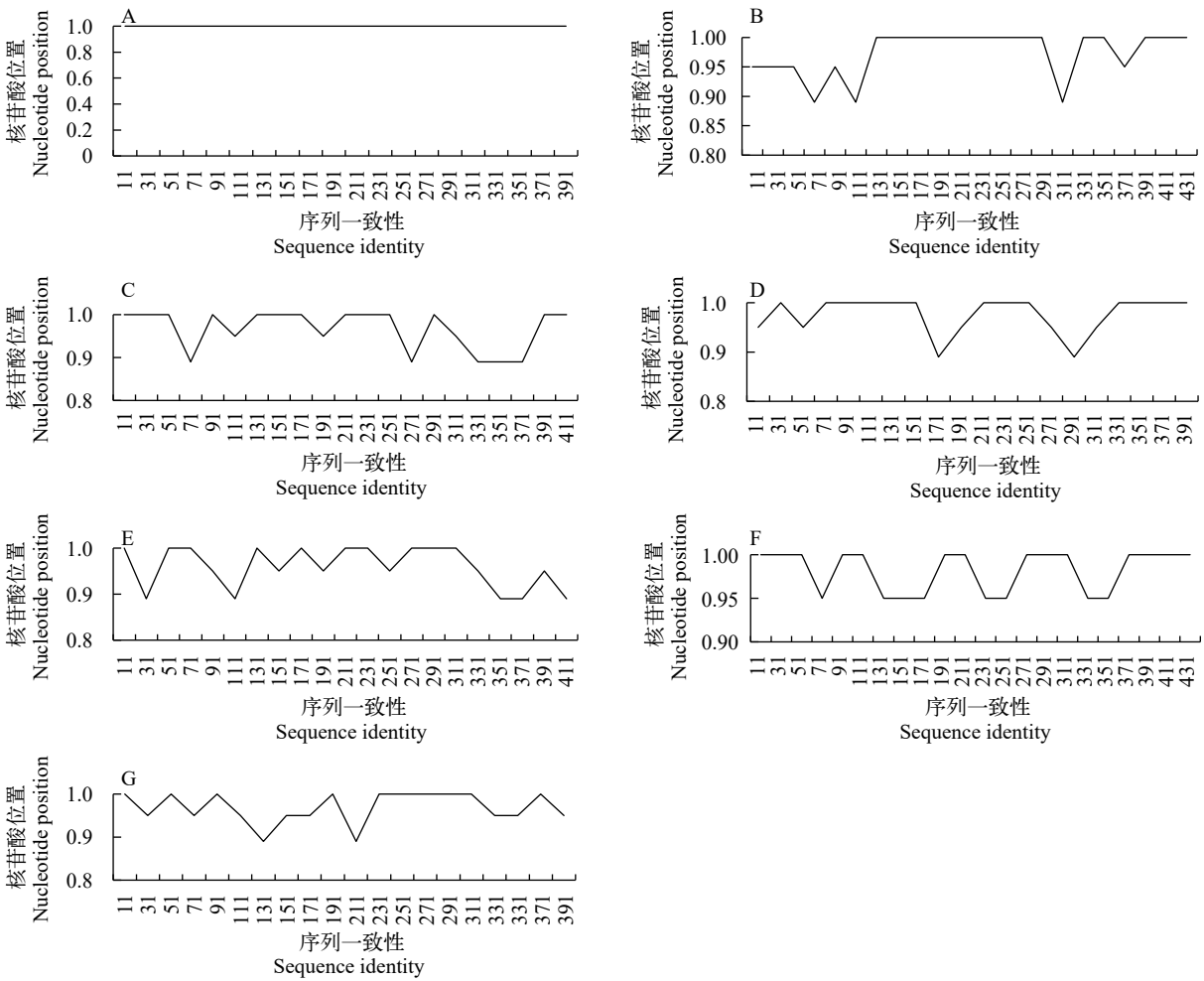


图2 重组的检测

Fig. 2 Detection of recombination

A—G分别为*ftsZ*、*glnA*、*gltX*、*gyrB*、*pgi*、*recA*和*tpi*序列相似性分析

A—G. *ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA* and *tpi* sequence similarity analysis

表3 微囊藻藻株基因多样性指数

Tab. 3 Genetic diversity index of *Microcystis* strains

位点Locus	L ^a	N ^b	H ^c	Π ^d	D ^e	D ^f
<i>ftsZ</i>	409.00	22.00	0.98(±0.05)	0.02	-0.32	0.12
<i>glnA</i>	451.00	31.00	0.96(±0.06)	0.02	-0.62	-0.71
<i>gltX</i>	429.00	31.00	0.98(±0.05)	0.03	-0.04	-0.44
<i>gyrB</i>	415.00	14.00	0.84(±0.10)	0.01	0.20	-0.26
<i>pgi</i>	422.00	39.00	0.98(±0.05)	0.03	-1.11	-0.98
<i>recA</i>	446.00	18.00	0.98(±0.05)	0.02	0.53	0.23
<i>tpi</i>	416.00	16.00	0.87(±0.11)	0.01	-0.86	-0.17
平均值Average	427.00	24.00	0.94(±0.49)	0.02	-0.32	-0.32

注: 所有参数使用DNAsp版本6.00计算。a. 序列长度; b. 总等位变异数; c. 种群中每个位点上平均期望杂合度; d. 核苷酸多样性; e. Tajima's *D* (Tajima, 1989) 检验, 所有的值与零没有显著的不同($P>0.10$); f. Fu and Li's *D*^{*} (Fu and Li, 1993) 检验, 所有的值与零没有显著的不同($P>0.10$)

Note: All parameters were calculated using DNAsp version 6.00; a. Sequence length; b. number of alleles; c. gene diversity; d. Nucleotide diversity; e. Tajima's *D* (Tajima, 1989). All values are not significantly different from zero ($P>0.10$); f. Fu and Li's *D*^{*} (Fu and Li, 1993). All values are not significantly different from zero ($P>0.10$)

最重要因素。MLST构建的进化树对于桥地区的序列进行了区分,表明在小生境内产生了一些具有小区域特征的变异,这与Huo等^[7]的研究结果相似。于桥水库微囊藻类遗传多样性高,可能是由于微囊藻包含多种不同的生态类型,遗传差异往往伴随着生境的差异。如果一个物种存在更多的生态类型,那么该物种将保持更高的遗传多样性,随着时间的推移,每个生态型都有其基于基因序列的分支^[42]。在微囊藻的系统发育树上观察到许多不同的分支,这表明每个分支可能代表一个独特的生态型。在

后续构建更庞大的MLST数据库的研究中还需要与具体藻株所处环境进行分析,结合藻类生理研究对北方水体中微囊藻广泛的遗传多样性形成机制进行进一步的探讨。

4 结论

结果表明,于桥水库存在多种不同的微囊藻的基因型。本研究认为中国北方地区微囊藻的遗传多样性较大,这在以往的研究中很少受到关注。将单基因分析与MLST方法进行比较,可以发现单基

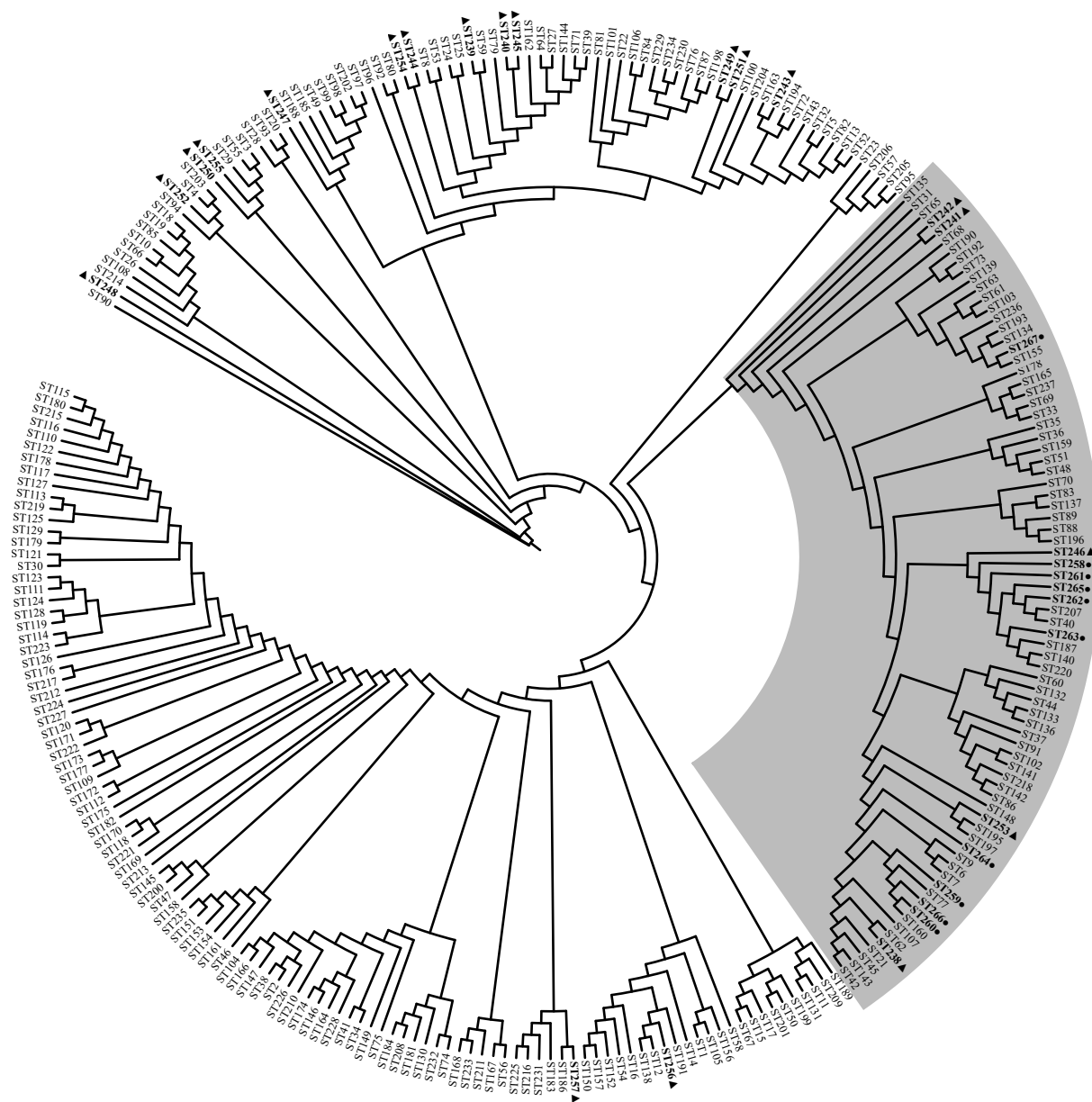


图3 利用于桥水库(●)、鄱阳湖(▲)和日本湖泊微囊藻属的STs进行系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis was performed on STs of *Microcystis* strains from Yuqiao Reservoir (●), Poyang Lake (▲) and Japanese lakes

使用最大似然算法对进化树进行计算,使用ITOL对进化树进行修饰

The maximum likelihood algorithm is used to calculate the tree, the ITOL was used to beautify the annotation of evolutionary tree

因系统发育拓扑结构是不完整的,这说明MLST可以提供更详细的信息。本文推测,于桥水库微囊藻受遗传漂变和小生境选择的共同影响在种群发展过程中发生了一些基因的亚型分化。后续对微囊藻MLST的研究中需要更加关注环境因素的潜在影响。

参考文献:

- [1] Xiao M, Li M, Reynolds C S. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis* [J]. *Biological Reviews*, 2018, **93**(3): 1399-1420.
- [2] Huisman J, Codd G A, Paerl H W, *et al.* Cyanobacterial blooms [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, **16**(8): 471-483.
- [3] Otsuka S, Suda S, Li R H, *et al.* Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2000, **46**(1): 39-50.
- [4] Otsuka S, Suda S, Shibata S, *et al.* A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**(3): 873-879.
- [5] Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins-occurrence, biosynthesis and impact on human affairs [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, **50**(1): 7-17.
- [6] Li X C, Dreher T H, Li R H. An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species [J]. *Harmful Algae*, 2016, **54**: 54-68.
- [7] Huo D, Chen Y X, Zheng T, *et al.* Characterization of *Microcystis* (Cyanobacteria) genotypes based on the internal transcribed spacer region of rRNA by next-generation sequencing [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018(9): 971.
- [8] Liu Y, Xu Y, Wang Z J, *et al.* Dominance and succession of *Microcystis* genotypes and morphotypes in Lake Taihu, a large and shallow freshwater lake in China [J]. *Environmental Pollution*, 2016(219): 399-408.
- [9] Whitaker R J. Allopatric origins of microbial species [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2006, **361**(1475): 1975-1984.
- [10] Thane Papke R, Ramsing N B, Bateson M M, *et al.* Geographical isolation in hot spring cyanobacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(8): 650-659.
- [11] Tanabe Y, Kasai F, Watanabe M M. Fine-scale spatial and temporal genetic differentiation of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: revealed by multilocus sequence typing [J]. *Environmental Microbiology Report*, 2009, **1**(6): 575-582.
- [12] Zhu M L, Xu Y, Li R H. Genetic diversity of bloom-forming *Microcystis* (cyanobacteria) populations in a hyper-eutrophic pond in central China [J]. *Current Microbiology*, 2012, **65**(3): 219-224.
- [13] Briand E, Escoffier N, Straub C, *et al.* Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population [J]. *The ISME Journal*, 2008, **3**(4): 419-429.
- [14] Mikalsen B, Boison G, Skulberg O M, *et al.* Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**(9): 2774-2785.
- [15] Janse I, Kardinaal W E A, Meima M, *et al.* Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(7): 3979-3987.
- [16] Tan W H, Liu Y, Wu Z X, *et al.* *cpcBA*-IGS as an effective marker to characterize *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondratieva (cyanobacteria) [J]. *Harmful Algae*, 2010, **9**(6): 607-612.
- [17] Liu M S, Cai F F, Wang Y L, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Microcystis* in Poyang Lake based on MLST [J]. *China Environmental Science*, 2019, **39**(7): 3081-3087. [柳满森, 蔡芳芳, 王一郎, 等. 基于MLST鄱阳湖微囊藻的遗传多样性及其系统发育研究[J]. *中国环境科学*, 2019, **39**(7): 3081-3087.]
- [18] Tanabe Y, Kasai F, Watanabe M M. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Microbiology-Sgm*, 2007, **153**(11): 3695-3703.
- [19] Maiden M C J, Bygraves J A, Feil E, *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(6): 3140-3145.
- [20] Wang Z Q, Qiu S F, Wang Y, *et al.* Progress in research on multilocus sequence typing technique [J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2010, **34**(1): 76-79. [王中强, 邱少富, 王勇, 等. 多位点序列分型技术及其研究进展 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, **34**(1): 76-79.]
- [21] Bartual S G, Seifert H, Hippler C, *et al.* Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, **43**(9): 4382-4390.
- [22] Blanchard A M, Jolley K A, Maiden M C J, *et al.* The applied development of a tiered multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Dichelobacter nodosus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018(9): 551.
- [23] Huo D, Chen Y X, Liu P, *et al.* Molecular detection of microbial communities associated with *Microcystis* vs

- Synechococcus* dominated waters in Tianjin, China [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, **36**(4): 1145-1156.
- [24] Chen R, Ju M T, Chu C L, *et al.* Identification and quantification of physicochemical parameters influencing chlorophyll-a concentrations through combined principal component analysis and factor analysis: a case study of the yuqiao reservoir in China [J]. *Sustainability*, 2018, **10**(4): 936.
- [25] Wen S L, Gong W Q, Wu T, *et al.* Distribution characteristics and fluxes of nitrogen and phosphorus at the sediment-water interface of Yuqiao Reservoir [J]. *Environmental Science*, 2018, **39**(5): 2154-2164. [文帅龙, 龚琬晴, 吴涛, 等. 于桥水库沉积物-水界面氮磷剖面特征及交换通量 [J]. 环境科学, 2018, **39**(5): 2154-2164.]
- [26] Vinçon-Leite B, Fadel A, Lemaire B J, *et al.* Short-term forecasting of cyanobacteria blooms in Yuqiao Reservoir, China [J]. *La Houille Blanche*, 2017(2): 35-44.
- [27] Knsai F, Kawchi M, Erata M. NIES-collection: List of Strains, Microalgae and Protozoa [M]. Japan: National Institute for Environmental Studies, 2004: 50-51, 58.
- [28] Shi F Y, Gao F L, Shen J G, *et al.* Sequence variation of P1 gene in *Potato virus Y* isolated from Fujian Province [J]. *Hereditas*, 2014, **36**(7): 713-722. [史凤阳, 高芳鑫, 沈建国, 等. 马铃薯Y病毒福建分离物P1基因的分子变异和结构特征 [J]. 遗传, 2014, **36**(7): 713-722.]
- [29] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(18): 2496-2497.
- [30] Tajima F. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585-595.
- [31] Hanage W P, Fraser C, Spratt B. Fuzzy species among recombinogenic bacteria [J]. *BMC Biology*, 2005(3): 6.
- [32] Wang J, Xie S L, Wang Z J, *et al.* Molecular diversity and microcystin production of *Microcystis* in Fenhe River of Taiyuan [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2011, **23**(4): 505-512. [王捷, 谢树莲, 王中杰, 等. 汾河(太原市景区段)微囊藻的分子多样性及产毒能力 [J]. 湖泊科学, 2011, **23**(4): 505-512.]
- [33] Zhang J, Zhang W Z, Wang H, *et al.* Progress in the relationships between *Microcystis* and aquatic bacteria [J]. *Acta Hydrobiologica Science*, 2019, **29**(3): 449-455. [张佳, 张蔚珍, 王欢, 等. 微囊藻与水体细菌相互关系的研究进展 [J]. 水生生物学报, 2019, **29**(3): 449-455.]
- [34] Huo D, Cao Q, Wang S Y, *et al.* The spatial distribution of *Microcystis* and microcystin and its relationship with environmental factors in Haihe Tianjin City [J]. *China Environmental Science*, 2018, **38**(10): 3897-3903. [霍达, 曹琪, 王素炎, 等. 海河天津段微囊藻及其毒素的空间分布及与水环境因子的关系 [J]. 中国环境科学, 2018, **38**(10): 3897-3903.]
- [35] Istock C A, Duncan K E, Ferguson N, *et al.* Sexuality in a natural population of bacteria-*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm [J]. *Molecular Ecology*, 1992, **1**(2): 95-103.
- [36] Castro N E, Chen H, Gladman S, *et al.* Population genomics and phylogeography of an Australian dairy factory derived lytic bacteriophage [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2012, **4**(3): 382-393.
- [37] Cheng Y, Lai X J. Numerical simulation of the effects of the ecological dredging on water quality in Yuqiao Reservoir [J]. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2019, **30**(3): 58-65. [程扬, 赖锡军. 生态清淤对于桥水库水质影响的数值模拟 [J]. 水资源与水工程学报, 2019, **30**(3): 58-65.]
- [38] Bian S W, Chan C, Wang Q L, *et al.* Research on eutrophic evaluation and control measures for Yuqiao Reservoir [J]. *Journal of Environmental Management College of China*, 2016, **26**(6): 47-50. [卞少伟, 陈晨, 王秋莲, 等. 于桥水库水质富营养化评价及防治对策研究 [J]. 中国环境管理干部学院学报, 2016, **26**(6): 47-50.]
- [39] Sun Q Q, Zhu W, Li M. Spatial and temporal variations of *Microcystis* colonies and their influencing factors in Gonghu Bay and Meiliang Bay of Lake Taihu [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2015, **27**(5): 865-872. [孙千千, 朱伟, 李明. 太湖贡湖湾和梅梁湾微囊藻群落的时空分布及其驱动因子 [J]. 湖泊科学, 2015, **27**(5): 865-872.]
- [40] Rosen M J, Davison M, Bhaya D, *et al.* Fine-scale diversity and extensive recombination in a quasisexual bacterial population occupying a broad niche [J]. *Science*, 2015, **348**(6238): 1019-1023.
- [41] Perez-Carrascal O M, Terrat Y, Giani A, *et al.* Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics [J]. *The ISME Journal*, 2019, **13**(12): 2887-2900.
- [42] Li Q, Lin F B, Yang C, *et al.* A large-scale comparative metagenomic study reveals the functional interactions in six bloom-forming *Microcystis*-epibiont communities [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, **9**(746): 1-14.

GENETIC DIVERSITY OF *MICROCYSTIS* STRAINS IN YUQIAO RESERVOIR BASED ON MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) APPROACH

ZHENG Tao, CAO Qi, ZHU Mei and QIAO Zhi-Yi

(College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin Key Laboratory of
Aqua-Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China)

Abstract: *Microcystis* is the most common cyanobacteria in China's freshwater, which has a great impact on ecological environment and urban domestic water. In order to explore the genetic diversity and phylogenetic relationship of *Microcystis* in Yuqiao Reservoir, MLST (Multilocus sequence typing) gene pool of the *Microcystis* of Yuqiao Reservoir was constructed based on 7 housekeeper genes (*ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA* and *tpi*) of 10 strains, meanwhile, the synthesis gene *mcyE*, cyanobacteria characteristic gene, cyanobacteria blue protein *cpcBA* gene and 16S rDNA gene of microcystins were determined. Based on the Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree, we compared STs of this study with STs in Poyang Lake and Japanese Lake, and found STs of Yuqiao Reservoir formed an independent branch. Phylogenetic analysis indicated that ten unique sequence types (STs) had high genetic diversity with a *H* value of 0.938 in *Microcystis*. Phylogenetic analysis showed that the existing *Microcystis* in Yuqiao Reservoir had the same ancestor and relative origin. The formation of *Microcystis* group structure in Yuqiao Reservoir may be caused by the combination of genetic drift of environmental selection and homologous recombination.

Key words: Genetic diversity; Multilocus Sequence Typing; Species molecular marker; *Microcystis*; Yuqiao Reservoir

《水生生物学报》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

主 编	桂建芳 (院 士)				
副主编	缪 炜 (研究员)	解绶启 (研究员)			
水生生物多样性与资源					
责任编辑	毕永红 (研究员)	刘焕章 (研究员)			
委 员	陈宜瑜 (院 士)	曹文宣 (院 士)	陈毅峰 (研究员)	陈勇生 (教 授)	
	何舜平 (研究员)	Martin Reichard	宋立荣 (研究员)	王克雄 (研究员)	
	吴小平 (教 授)	徐旭东 (研究员)	张承才 (研究员)	朱新平 (研究员)	
	庄 平 (研究员)				
水生态与环境					
责任编辑	王洪铸 (研究员)	周巧红 (研究员)			
委 员	唐启升 (院 士)	Annette Janssen	陈宇顺 (研究员)	韩博平 (教 授)	
	黄邦钦 (教 授)	刘家寿 (研究员)	Ralf Aben	吴辰熙 (研究员)	
	吴庆龙 (研究员)	吴振斌 (研究员)	谢 平 (研究员)	杨 军 (研究员)	
	张 黎 (研究员)	赵亚乾 (教 授)	周炳升 (研究员)	周集中 (教 授)	
渔业与生物技术					
责任编辑	肖武汉 (研究员)	周 莉 (研究员)			
委 员	麦康森 (院 士)	包振民 (院 士)	刘少军 (院 士)	艾庆辉 (教 授)	
	段存明 (教 授)	葛 伟 (教 授)	何建国 (教 授)	胡 炜 (研究员)	
	李创举 (研究员)	李富花 (研究员)	鲁义善 (教 授)	梅 洁 (教 授)	
	聂 品 (研究员)	秦启伟 (教 授)	石连玉 (研究员)	宋林生 (教 授)	
	徐 跑 (研究员)	殷 战 (研究员)	张永安 (教 授)	周志刚 (研究员)	
	邹 钧 (教 授)				
编辑部	杜新征 (副编审)	余 茜 (编 辑)	叶文娟 (编 辑)		