

中国蓝藻的新记录属——双囊藻属 (*Geminocystis*) 及分类和生态学讨论^{*}

马苏超¹, 王一郎^{2,3}, 敖鸿毅², 虞功亮², 李守淳¹, 李仁辉^{2**}

(1: 江西师范大学生命科学学院, 南昌 330000)

(2: 中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072)

(3: 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 现代分子生物学技术为蓝藻的生物多样性研究提供了更多信息和证据. 单细胞蓝藻——双囊藻属 (*Geminocystis*) 是 2009 年从集胞藻 (*Synechocystis*) 分离出来的新属. 2017 年 5 月从青海湖的封闭子湖——月牙湖采集分离到一株单细胞蓝藻藻株, 16S rRNA 基因序列显示此藻株和双囊藻的藻种显示出最高的相似性, 都在 97% 以上, 并且在分子系统树聚为一束. 此株的细胞结构以及超微结构显示, 细胞纵轴具有窝式结构以及类囊体不规则的排列等双囊藻属所具有的特征. 双囊藻是我国蓝藻的新报道记录属, 本研究还对双囊藻的分类和生态进行了讨论.

关键词: 双囊藻; 蓝藻; 多样性; 分类; 16S rRNA; 新记录属; 青海湖

A newly recorded cyanobacterial genus *Geminocystis* in China and its taxonomic and ecological notes

MA Suchao¹, WANG Yilang^{2,3}, AO Hongyi², YU Gongliang², LI Shouchun¹ & LI Renhui^{2**}

(1: College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330000, P.R.China)

(2: Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P.R.China)

(3: University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China)

Abstract: Modern molecular biological technology has provided much information and evidence for cyanobacterial diversity. Unicellular cyanobacterial genus *Geminocystis* was established in 2009 by separating from *Synechocystis*. In this study, a cyanobacterial strain was isolated in May 2017 from Lake Yueya—a small and enclosed lake close to the Lake Qinghai. This strain shows the close similarities of 16S rRNA gene sequences to the strains of *Geminocystis* as over 97%, and group with the strains into a cluster in the phylogenetic tree. The keritomized content and irregular arrangement of thylakoid in cells of this strain represent the unique features of the *Geminocystis* genus. The *Geminocystis* genus is firstly reported in China, and its taxonomic and ecological notes are discussion in this study.

Keywords: *Geminocystis*; Cyanobacteria; diversity; taxonomy; 16S rRNA; new recorded genus; Lake Qinghai

现代生物技术的发展, 特别是分子生物学的快速发展, 为蓝藻的多样性研究提供了更多的信息和证据. 蓝藻的分类系统特别是在属水平上的分类修订也一直在持续不断地进行. 在 2000—2014 年已经成立了 66 个蓝藻新属^[1]. 在属以上更好的分类阶层和系统也发生了较大的变化, 从 1970s—1980s 的经典四目系统, 到 2005 年 Hoffmann 等提出的四亚纲七个目系统^[2], 一直到 2014 年 Komárek 等提出的八目系统^[1]. 这些新的分类修订为蓝藻建立更加合理的分类体系做出了较好的尝试, 为在更大范围和更重要的类群中分类修订打下了较好的基础. 但是蓝藻内部属的自然分类系统的建立, 仍是今后蓝藻分类系统和分类修订的基础工作.

双囊藻属 (*Geminocystis*) 是 2009 年 Korelusova 等从集胞藻属 (*Synechocystis*) 分离出来的新属. 在对许多

* 国家科技基础性工作专项 (2014FY210700) 资助. 2018-03-25 收稿; 2018-05-10 收修改稿. 马苏超 (1992~), 男, 硕士研究生; E-mail: 1720231256@qq.com.

** 通信作者; E-mail: reli@ihb.ac.cn.

集胞藻藻种的 DNA 检测结果显示,*Synechocystis* PCC6308 的 16SrRNA 基因序列同集胞藻的模式种类(*S. aquatilis*)以及 *Synechocystis* PCC6803 的 16SrRNA 基因序列相似度低于 90%,这个数值已经明显地低于细菌分类和现代蓝藻分类的属的范围,所以主要根据 *Synechocystis* PCC6308 的这个特征建立了双囊藻以及模式种类海氏双囊藻(*Geminocystis herdmanii*),现在双囊藻属还有另外一个种类巴布亚双囊藻(*Geminocystis papuanica*).进一步研究表明,双囊藻在系统进化上是蓝菌藻(*Cyanobacterium*)的姐妹类群^[3].

在我们调查中国的蓝藻多样性特别是以前较少关注的色球藻目的多样性中,我们从青海湖的封闭子湖——月牙湖采集分离到一株蓝藻藻株,通过 16S rRNA 基因序列的检测,发现此藻株和双囊藻的藻种显示出最高的相似性,并且聚为一束.进一步进行形态学和超微结构的观察研究,确定此藻株为双囊藻的一个种类.这也是我国对双囊藻属的新记录属的报道.

1 材料与方法

1.1 样品的采集

于 2017 年 5 月在青海省青海湖南岸二郎剑风景区附近的月牙湖水域(36°39′18.0″N,100°22′14.8″E,海拔 3197 m)使用 25#浮游生物网采集水体表层浮游藻类,采集地环境因子如下:水体盐度 6‰;温度 17.1℃;pH 值 9.05.

1.2 藻种分离

使用灭菌过的新鲜 CT 培养基对 25#浮游生物网采集的水样进行富集培养(培养温度为 25℃,光照强度为 25 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期为 12 h:12 h)^[4],10 天后采用经典的毛细管分离法对富集后的培养物进行藻种分离:将巴斯德吸管做成毛细管,在 100 倍倒置显微镜下挑取单根藻丝或单藻细胞,移取至无菌水中清洗 5~6 次,然后转移至预装有灭菌过的新鲜 CT 培养基的 24 孔细胞培养板中培养(培养方法同上).培养 20 天后得到纯藻种,纯化后的藻种转接到含有 5 ml CT 培养基的螺口玻璃管中,保存在中国科学院水生生物研究所有害藻类生物学学科组的藻种库中,藻种编号为 CHAB6541.

1.3 藻细胞形态观察和主要光合色素检验

藻体形态的观察使用 Nikon eclipse 80i 型光学显微镜,外接 1270 万像素的数码相机(DS-Ri1)和相适应的台式计算机.数码拍照及数据测量通过其附带的图像分析软件 NIS-Elements D 3.2 进行.在拍照及测量过程中,随机选取 50 个以上的藻细胞进行各项数据的测量与统计.细胞色素检验使用叶绿素 a(激发波长 440 nm,发射波长 680 nm)、藻红蛋白(激发波长 525 nm,发射波长 570 nm)和藻蓝蛋白(激发波长 595 nm,发射波长 630 nm).

1.4 藻细胞 DNA 提取和 16S rRNA 基因序列的测定

对纯化的藻株扩大培养后,参考 Lin 等^[5]的方法进行 DNA 的提取.用于扩增 16S rDNA 及 16S~23S 间 ITS 序列的引物为 PA 和 B23S^[6-7],由上海英俊生物技术有限公司合成. PCR 反应体系为 50 μl ,包含 200 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L MgCl_2 、1×buffer PCR 缓冲液、10 pmol 引物、1 U Taq DNA 聚合酶. PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 5 min. PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,通过胶回收试剂盒回收(Bio Flux),克隆到载体 pMD18-T 上(Takara, Japan).将克隆载体转入感受态细胞 E.coli DH5 α 中,阳性克隆送武汉艾康健生物科技有限公司进行双向测序,测序后得到序列片段用 Bio Edit 软件拼接.

1.5 分子系统学分析

序列通过 NCBI 的 BLAST 进行比对,从 GenBank 数据库中下载的基因序列用于系统进化树的构建.将所有序列用 MAFFT v7.312 软件进行多重序列比对后^[8],对多重序列比对结果运用 Mega v.7.0.14 软件做保留保守区,去除高变区及模糊区处理.对获得的多重序列比对结果在 Jmodeltest 2 软件上采用赤池信息量准则(AIC)标准选择核酸替代模型(GTR+I+G)^[9],用于贝叶斯分析(BI)和最大似然法(ML)分析,并再次采用 Mega v.7.0.14 软件以邻接法(NJ tree)构建系统发育树.邻接法采用 Maximum Composite Likelihood 为核酸替代模型,步展值(bootstrap value)设为 1000,空位或缺失位点均当作配对删除(pairwise deletion)处理.最大似然法分析采用 IQ-TREE 软件^[10],模型为 GTR+I+G,步展值设为 1000.贝叶斯分析采用 MrBayes v3.2.6 以

随机树起始^[11],运行 10000000 代,每 100 代取样,剔除 25% 老化样本,至平均标准偏差低于 0.01 以下,根据剩余的样本构建进化树,分枝支持率用贝叶斯后验概率表示. ML、NJ 和 BI 3 个系统发育树均以 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 为外类群.

1.6 ITS 二级结构分析

ITS(转录间隔区)D1-D1'螺旋结构和 Box-B 螺旋采用 Mfold 3.2^[12] 软件构建 ITS 二级结构,设置均为默认.

2 结果

2.1 双囊藻的形态描述

在液体 CT 培养基培养状态下,细胞球形、微卵形或微椭圆形,细胞颜色为浅蓝色、亮绿色,衰亡期细胞逐渐呈灰色(图 1a~c). 单生,无胶被,不形成菌落. 细胞直径范围为 2.71~4.22 μm ,平均直径为 3.34 μm . 细胞成分均质,含有叶绿素 a(图 1d)和藻蓝素(图 1e),无明显藻红素(结果不显示). 细胞纵轴具有窝式结构(keratomized content),为类囊体在细胞纵向的排列(图 1b,图 2). 超微结构显示细胞的类囊体排列不规则,有周生加上中生排列,也有很多明显的纵向排列(图 2b). 细胞无气囊结构,分裂方式为二分裂.

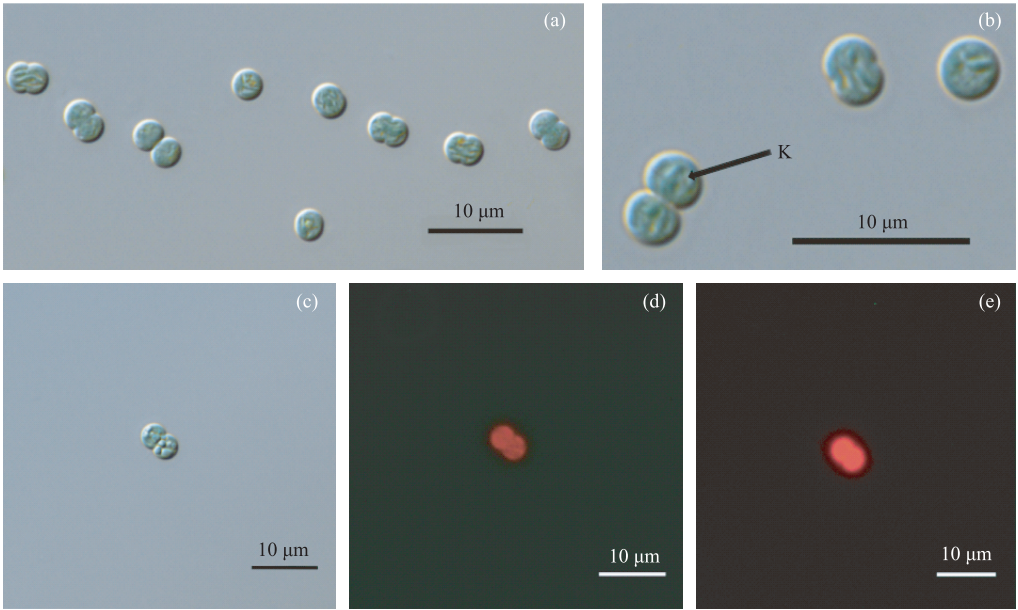


图 1 光学显微镜下 *Geminocystis* sp. CHAB6541 的形态(a、b、c 为可见光下 CHAB6541 细胞形态; d 为 CHAB6541 细胞中的叶绿素分布; e 为 CHAB6541 细胞中的藻蓝素分布; K 为窝式结构)

Fig.1 Light microscopic image of *Geminocystis* sp. CHAB6541 (a-c show cell morphology of CHAB6541 under visible light; d shows distribution of chlorophyll in CHAB6541 cells; e shows distribution of phycocyanin in CHAB6541 cells; K = keratomized content)

2.2 分子系统学分析

采用上述引物扩增 CHAB6541 基因组,获得了全长为 1862 bp 的 16S rRNA、ITS 和部分 23S rRNA 序列, Genbank 号为 MH094654. 其 16S rRNA 序列部分在 NCBI 进行 Blast 分析发现,CHAB6541 藻株与来自日本的 NIES3708 和 NIES3709 及法国巴斯德藻种库的 *Synechocystis* sp. PCC6308 表现出较高的相似性(表 1). 截取了最大可使用的 1305 bp 多重比对位点,构建系统发育树,其结果表明,CHAB6541 同 *Geminocystis* 属下藻株聚类在一起(图 3).

CHAB6541 的 ITS 序列上含有 Ile 和 Ala 两个 tRNA 编码基因,其二级结构与 Komárek 等^[11] 发表的二级

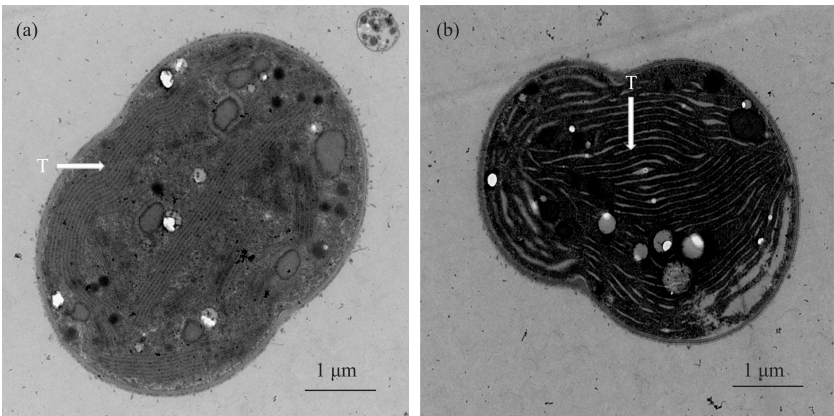


图2 透射电子显微镜下的 *Geminocystis* sp. CHAB6541 的形态
(a 和 b 分别代表正常生长细胞和衰亡期细胞的超微结构, T 为类囊体)
Fig.2 Transmission electron microscopy(TEM) images of *Geminocystis* sp. CHAB6541
(a and b show ultrastructure of normal cells and aged cells; T represents thylakoid)

结构略有差异(表2). *Geminocystis* sp. CHAB6541 和 *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 的 D1-D1' 螺旋结构相同;基部茎包含一 7 bp 螺旋,末端环状结构含有 4 bp. 两株双囊藻的 Box-B 螺旋结构不同;*Geminocystis* sp. CHAB6541 基部茎包含一 8 bp 螺旋,末端环状结构含有 4 bp;而 *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 基部茎包含一 6 bp 螺旋,虽然末端环状结构同样含有 4 bp,但是环状结构 5' 端一腺嘌呤变为鸟嘌呤. 两株双囊藻的 V3 结构也不同;*Geminocystis* sp. CHAB6541 基部茎包含一 8 bp 螺旋,末端环状结构含有 4 bp;而 *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 基部茎包含一 7 bp 螺旋,末端环状结构相同.

表 1 *Geminocystis* 属下不同藻株的 16S rRNA 基因序列相似性比较

Tab.1 The 16S rRNA gene evolutionary distances matrix (%) among different strains of *Geminocystis*

藻株	1	2	3	4
1 <i>Geminocystis</i> sp. CHAB 6541				
2 <i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308 AB039001	97.49			
3 <i>Geminocystis papuanica</i> PAP1 EF555569	97.60	97.95		
4 <i>Geminocystis</i> sp. NIES-3709 AP014821	97.09	97.84	98.70	

表 2 *Geminocystis* sp. CHAB6541 和 *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 的 16S~23S rRNA 内部转录间隔区(ITS)二级结构的比较

Tab.2 Comparison of secondary structures of ITS of 16S~23S rRNA between *Geminocystis* sp. CHAB6541 and *Geminocystis herdmanii* PCC 6308

藻株	<i>Geminocystis</i> sp. CHAB6541	<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308
D1-D1'	A A G G U A A U C A C U A U U A G	A A G G U A A U C A C U A U U A G
Box-B	A U G U U C A G U A A A C A A G U C G U	A U G U U C A C A G C A A G U G
V3	G A G U A C G A C A A G C A U G U U G U	G A G U A G G G U A G C A U C C U A
tRNA	Ile,Ala	Ile,Ala

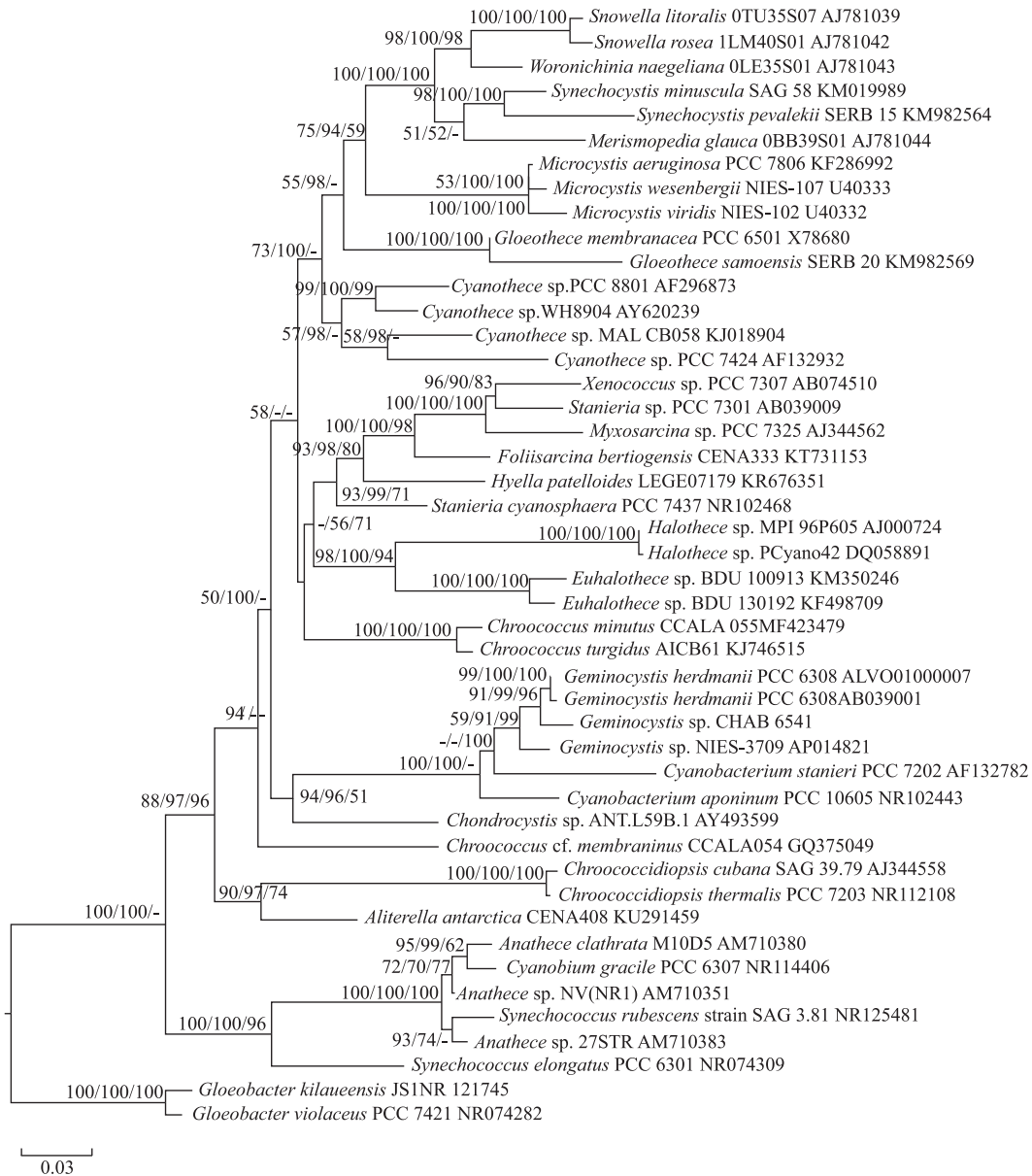


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的 ML/BI/NJ 分子系统树
(节点处数字表示在 ML/BI/NJ 中大于 50% 的支持数值)

Fig.3 ML/BI/NJ phylogenetic trees based on 16S rRNA sequences

(Numbers at each node represent over 50% supporting values in ML/BI/NJ phylogenetic trees)

3 讨论

近年来,我国湖泊生态系统中蓝藻的种类结构和丰度引起了关注,特别是水华蓝藻。所以对蓝藻多样性研究的进展和动态,例如新的类群和记录,也需要密切跟踪。蓝藻的分子系统和分类修订是现代蓝藻多样性研究的主要内容。新属的创建也是蓝藻分类修订的主要部分。本研究中的双囊藻和集胞藻以及蓝菌藻属在

最新的 Komárek (2014) 分类系统中都属于色球藻目的色球藻科、平裂藻科和聚球藻科^[1]。特别是集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 是在 1997 年蓝藻中的第 1 个全基因组测序的藻种,也因此成为蓝藻基础生物学研究的最重要和最常用的模式生物。由于单细胞结构的特性,很多有关微囊藻水华生物学特征和过程的研究都是以 *Synechocystis* sp. PCC 6803 作为模式生物来进行比较和类推的^[3]。*Synechocystis* sp. PCC 6308 非常容易和 *Synechocystis* sp. PCC 6803 混淆,一直也是归类在相同的 *Synechocystis* 属内。可是由于 16S rRNA 基因序列的较大差别(小于 90% 相似度),将 *Synechocystis* sp. PCC 6308 定为蓝藻里的新属——双囊藻属(*Geminocystis*)^[3]。根据细菌学分类方法,属和种水平上的分界线分别设立为 16S rRNA 基因序列的相似度 95% 和 97%^[1],所以双囊藻属的建立也是得到认可的。通过进一步观察研究,发现双囊藻属的细胞内有条状窝式结构。只有蓝藻里极少数的几个属具有这种窝式结构,例如我们在洱海发现的丝状蓝藻常丝藻属(*Tychonema*)^[13]。超微结构也显示双囊藻细胞的类囊体排列不规则。所以,在形态、超微结构以及 DNA 分子序列上双囊藻都显示出和集胞藻属不同的地方。近年来双囊藻在希腊、巴西和日本等地也相继被报道^[14-16],特别是从在日本溪流中分离的 *Geminocystis* sp. NIES3709 的全基因组被测序发表^[16],显示出对双囊藻属蓝藻的关注度增加。全球已报道的双囊藻属的藻种生境和生态习性显示出非常高的多样性,有湖泊、溪流、土壤、温泉和盐池等。通过检测 16S rRNA 基因序列,发现从青海湖地区分离的单细胞蓝藻藻种 CHAB6541 的序列和双囊藻属内的几个藻种序列的相似性最高,都大于 97%,并且在分子系统树中聚为一簇。观察藻种形态和超微结构,发现了细胞内窝式结构和不规则的类囊体排列,进一步证实了我们在属水平上的鉴定结果。在种的鉴定上,ITS 二级结构和 *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 很相近,但是由于和已经报道的藻种的 16S rRNA 基因序列相似度只有 97% 左右(表 1),所以现阶段并不能很好地鉴定到种类,还是以 *Geminocystis* sp. CHAB6541 表示。双囊藻属在我国属于首次报道,也显示了我国蓝藻生物的潜在多样性。此次在青海湖地区的小湖泊中发现的浮游习性双囊藻,因此更加关注其是否会在我国更多生境和更多的湖泊中,特别是长江中下游的浅水富营养化湖泊中有分布。我们期待更加先进的生物测定技术如宏基因组和高通量测序技术在湖泊蓝藻研究中的纵深应用能回答这个问题并带来新的蓝藻多样性的信息。

4 结论

本研究从我国青海湖地区的小湖泊中分离到一株单细胞蓝藻藻株,通过 16S rRNA 基因序列显示此藻株和双囊藻的已报道的藻种显示出最高的相似性,都在 97% 以上,并且在分子系统树聚为一束。此蓝藻株的细胞结构以及超微结构显示细胞纵轴具有窝式结构以及类囊体不规则的排列,进一步确认它具有双囊藻所拥有的独特特性。这是我国首次报道浮游特性的双囊藻新纪录属。

5 参考文献

- [1] Komárek J, Kaštovský J, Mareš J *et al.* Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 2014, **86**(4): 295-335.
- [2] Hoffmann L, Komárek J, Kaštovský J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)-state in 2004. *Algological Studies*, 2005, **117**(1): 95-115.
- [3] Korelusova J, Kaštovský J, Komárek J. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis*. *Journal of Phycology*, 2009, **45**(4): 928-937.
- [4] Ichimura T. Isolation and culture methods of algae. *Methods in Phycological Studies*, 1979: 294-305.
- [5] Lin S, Shen J, Liu Y *et al.* Molecular evaluation on the distribution, diversity, and toxicity of *Microcystis* (Cyanobacteria) species from Lake Ulungur—a mesotrophic brackish desert lake in Xinjiang, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, **175**(1/2/3/4): 139-150.
- [6] Edwards U, Rogall T, Blöcker H *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(19): 7843-7853.
- [7] Lepère C, Wilmette A, Meyer B. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants*, 2000: 275-283.
- [8] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.

- ty. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(4): 772-780.
- [9] Darriba D, Taboada GL, Doallo R *et al.* JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 2012, **9**(8): 772.
 - [10] Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(W1): W232-W235.
 - [11] Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 2012, **61**(3): 539-542.
 - [12] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(13): 3406-3415.
 - [13] Wei ZH, Zhu ML, Yu GL *et al.* Occurrence of planktonic cyanobacterium *Tychonema bourrellyi* in Erhai Lake and its taxonomic studies. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(6): 1171-1175. [卫志宏, 朱梦灵, 虞功亮等. 洱海的浮游蓝藻布氏常丝藻及其分类学的讨论. 水生生物学报, 2012, **36**(6): 1171-1175].
 - [14] Bravakos P, Kotoulas G, Skaraki K *et al.* A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of Cyanobacteria from thermal springs of Greece. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016, **98**: 147-160.
 - [15] Andreote APD, Vaz MGMV, Genuário DB *et al.* Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology*, 2014, **50**(4): 675-684.
 - [16] Hirose Y, Katayama M, Ohtsubo Y *et al.* Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. strain NIES-3709, which harbors a phycoerythrin-rich phycobilisome. *Genome Announcements*, 2015, **3**(2): e00385-15.