

## 广东省千灯湖拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) 的形态和产毒能力的株间差异及系统进化\*

路 琰, 雷敏婷, 叶金梅, 雷腊梅\*\*, 韩博平

(暨南大学生命科学技术学院生态学系, 广州 510632)

**摘 要:** 拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) 是一种入侵蓝藻, 能够产生拟柱孢藻毒素 (cylindrospermopsin, CYN), 严重危害人类健康. 现有研究表明该藻已在我国广泛分布, 更是华南地区常见的水华蓝藻, 但目前对其产毒和起源还缺乏了解. 本研究以中国广东省千灯湖分离出的 10 株拟柱孢藻为材料, 对它们的生长、形态和产毒特性进行了观测, 并构建了基于 *nifH* 和 *rpoC1* 基因的双基因系统进化树. 结果表明, 10 株拟柱孢藻藻丝体形态均呈笔直型, 除 QDH1 藻株外, 其他的拟柱孢藻均可产生端生异形胞, 厚壁孢子也常有出现; 10 藻株丝体的平均长度在 41.0~77.7  $\mu\text{m}$  之间, 宽度在 2.433~3.125  $\mu\text{m}$  之间, 它们的长宽比值差异显著. 10 藻株的比生长速率差异极显著, 为 0.075~0.174  $\text{d}^{-1}$ . 检测发现 10 株藻中仅 QDH7 藻株可检测到 6 个 CYN 合成酶基因, 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 分析表明该藻株主要产生 deoxy-CYN 异构体, 其浓度可达 1745.19  $\text{ng/mL}$ . 系统进化分析表明千灯湖的拟柱孢藻与澳大利亚、欧洲和国内其他地区的藻株同源性较高, 但基于 *rpoC1* 和 *nifH* 基因不能区分千灯湖的产毒藻株和非产毒藻株. 本研究证实了广东省水体中存在产毒拟柱孢藻, 需防范这类新型产毒蓝藻水华所带来的生态风险.

**关键词:** 拟柱孢藻; 千灯湖; 产毒特性; 系统进化

## Intraspecific variation of morphological traits and toxin-producing capacity and phylogenetic analysis for *Cylindrospermopsis raciborskii* from Qiandenghu Lake, Guangdong Province\*

LU Yan, LEI Minting, YE Jinmei, LEI Lamei\*\* & HAN Boping

(Department of Ecology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, P.R.China)

**Abstract:** The invasive cyanobacterial species *Cylindrospermopsis raciborskii* is able to produce cylindrospermopsin (CYN) that cause serious damage to human health. The published studies have showed that *C. raciborskii* has been widely distributed in China, and appeared to be a common species in southern China. However, its origin and toxicity potential are still unknown. In this study, ten strains of *C. raciborskii* isolated from Qiandenghu Lake (QDH), Guangdong Province were used to observe their growth, morphology, toxin production and phylogeography based on *nifH* and *rpoC1* genes. Our results showed that filaments of all *C. raciborskii* strains were straight. Apical heterocysts were observed in all *C. raciborskii* strains except the strain QDH1 and akinetes were also commonly appeared. The average filament length and width of ten strains ranged from 41.0 to 77.7  $\mu\text{m}$  and from 2.433 to 3.125  $\mu\text{m}$ , respectively, with a significant difference between strains. The specific growth rates of the 10 strains were also significantly different, ranging from 0.075 to 0.174  $\text{d}^{-1}$ . PCR analysis showed that only QDH7 gave positive amplification with six CYN synthesis genes. The strain was further analyzed by LC-MS/MS and confirmed to mainly produce deoxy-CYN isomer with the concentration of 1745.19  $\text{ng/mL}$ . Phylogenetic analysis suggested that *C. raciborskii* from Qiandenghu Lake has high homology with the Australian, European and other Chinese strains, but the toxin-producing strains and non-toxin-producing strains in Qiandenghu Lake cannot be distinguished by *rpoC1* and *nifH* genes. This study demonstrated the existence of CYN-producing *C. raciborskii* in water bodies of Guangdong Province, which highlights that it is necessary to prevent the ecological risks related to the newly emerging

\* 2019-04-29 收稿; 2019-08-19 收修改稿.

国家自然科学基金项目 (31770507) 和广东省水利科技创新项目 (2016-29) 联合资助.

\*\* 通信作者; E-mail: tleilam@jnu.edu.cn.

toxic cyanobacterial bloom.

**Keywords:** *Cylindrospermopsis raciborskii*; Qiandenghu Lake; toxin-producing capacity; phylogeny

拟柱孢藻是热带和亚热带常见的水华藻类之一,具有较强的入侵能力和产毒能力. 产 CYN 的拟柱孢藻于 1979 年在澳大利亚 Palm 岛首次被发现,致使 148 人中毒,引起呕吐、厌食和肝肿大等症状<sup>[1]</sup>. 拟柱孢藻毒素是一类环肽类生物碱<sup>[2]</sup>,对小鼠具急性毒性,腹腔注射小鼠的 LD<sub>50</sub> 为 2.1 mg/kg<sup>[2]</sup>. 研究表明,CYN 具有肝毒性,神经毒性和细胞毒性,能够抑制谷胱甘肽、细胞色素 P450 和蛋白质的合成,是一种潜在的致癌物<sup>[3-5]</sup>. Humpage 等<sup>[6]</sup>以 CYN 每日最低可见有害作用水平 30 μg/kg 为基准,建议饮用水中的浓度限值为 1 μg/L. 目前在澳大利亚<sup>[7]</sup>、新西兰<sup>[8]</sup>、东亚、东南亚以及沙特阿拉伯<sup>[9-11]</sup>等地区都发现了能够产 CYN 的拟柱孢藻. Mihali 等首次在 *C. raciborskii* AWT205 藻株中揭示了拟柱孢藻毒素合成酶基因簇的分子特征<sup>[12]</sup>. 该基因簇全长 43 kb,共包含 15 个开放阅读框:肽基转移酶基因 *cyrA*,PKS/NRPS 基因 *cyrB*、*cyrC*、*cyrD*、*cyrF* 和 *cyrE*,尿嘧啶环形成基因 *cyrG* 和 *cyrH*,裁剪酶基因 *cyrI*、*cyrJ* 和 *cyrN*,运输基因 *cyrK*,调控基因 *cyrO*,转座酶基因 *cyrL* 和 *cyrM*. 而基于产毒基因的分子技术具有简单、快速、灵敏等优点,已广泛应用于蓝藻毒素的相关研究,在检测拟柱孢藻的产毒潜能中也逐步得到应用<sup>[13]</sup>.

研究认为拟柱孢藻的成功入侵性主要是由于其能够耐受多种环境条件,如低光照,低温和低营养可利用性<sup>[7]</sup>. 此外,Bonilla 等也将其生态成功归因于高的表型可塑性<sup>[14]</sup>,这种可塑性实际上来源于多个生态型(即藻株)的存在,而每个生态型都有自己的最佳生理需求<sup>[15]</sup>. 即使是分离自同一水体的两株拟柱孢藻同样在形态、藻丝体长度、生长、光照以及温度和营养盐等方面存在差异<sup>[16]</sup>. 拟柱孢藻的各个株系并不都产毒,产毒和非产毒株系往往在形态上没有差别,但两者在遗传特征和生理特性上差异较大,此外产毒藻株间也有毒性强弱和毒素种类不同之分<sup>[10,17-18]</sup>. 拟柱孢藻藻株间的差异反映了其高度适应性的策略,推测这也是拟柱孢藻能够快速地理扩张的主要驱动力<sup>[7]</sup>.

蓝藻的分子生物学研究起始于 1960s,并被广泛应用于蓝藻分子系统学的研究,随后形成了一门新兴学科藻类分子系统学. 运用于蓝藻系统发育研究的分子标记包括 16S rDNA、16S~23S rRNA 基因间隔序列(ITS)和 RNA 聚合酶 *rpoC* 等<sup>[19]</sup>. 由此可见,系统进化树是描述某物种进化历史的重要形式. 关于拟柱孢藻的发生和扩散主要有两种假说,第 1 种假说认为拟柱孢藻的扩散存在非洲和澳大利亚两个扩散中心<sup>[20]</sup>;第 2 种假说则认为拟柱孢藻对温带地区的入侵不是来自于非洲或澳大利亚,而是每个大陆的温暖避难区<sup>[21]</sup>,即拟柱孢藻是从较温暖的避难地区向美洲和欧洲扩散<sup>[22]</sup>. 但最近有研究对上述两个假说均提出质疑,Cirés 等根据 *cpcBA*-IGS 和 *nifH* 基因共建系统进化树,结果发现西班牙的藻株与美洲的拟柱孢藻藻株聚在一起,明显与欧洲其他藻株分开<sup>[23]</sup>,而以前的研究一直认为西班牙藻株是欧洲-亚洲组的一部分,这表明现有的拟柱孢藻系统地理学和扩散途径的假设还有待进一步验证. Manthos 等在对希腊的拟柱孢藻藻株进行了系统进化分析提出南美和非洲两个辐射中心,南美辐射中心随后向南美、突尼斯、希腊或西班牙扩张,非洲辐射中心导致了拟柱孢藻从非洲到澳大利亚,然后再向亚洲和欧洲的扩张<sup>[24]</sup>,它为拟柱孢藻的全球扩散提供了一种新的解释.

我国是世界上水体富营养化最严重的国家之一,拟柱孢藻已在多个省份分布,如广东省、福建省、云南省、湖北省、台湾省、山东省和北京等<sup>[10-11,25-27]</sup>. 尤其在南亚热带地区,拟柱孢藻已逐渐取代微囊藻成为水体的优势种群<sup>[28]</sup>,但关于该地区拟柱孢藻产毒特征的研究几乎空白. 本研究以从广东省千灯湖分离的 10 株拟柱孢藻为材料,观察了它们的基本形态特征,采用基于多个 CYN 毒素合成酶基因的 PCR 检测和 LC-MS/MS 对藻株的产毒能力进行了联合分析,并构建了 *rpoC1* 和 *nifH* 双基因序列的系统发育树. 本研究可初步了解南亚热带地区拟柱孢藻的产毒特征和进化起源,为拟柱孢藻水华的风险评估提供参考.

## 1 材料和方法

### 1.1 藻株的分离与形态观察

千灯湖(23°2'59"N,113°8'29"E)位于广东省佛山市,总库容为  $5.6 \times 10^5 \text{ m}^3$ ,平均水深 2 m,属于亚热带海洋性季风气候,夏季高温多雨,冬季温和少雨,为小型景观湖泊. 水样于 2017 年 9 月—2018 年 2 月期间每月

采集一次,藻株的分离方法为使用玻璃毛细管在显微镜下吸取单根藻丝体,在无菌水滴中冲洗 5~6 次,转移到含有 1 mL WC 培养基的 24 孔细胞培养板中. 培养温度为  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度为  $35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光周期为 12 h:12 h. 20 d 左右使用 OLYMPUS TH4-200 倒置显微镜镜检,将分离成功的藻株转移至 50 mL 锥形瓶中继续扩大培养,共计分离出 10 株拟柱孢藻,命名为 QDH1~QDH10.

为观察 10 株拟柱孢藻生长和形态差异,在 50 mL Pyrex 玻璃管中加入 35 mL 藻液,每藻株设置 3 个重复,使用 TD-700 叶绿素荧光仪测定叶绿素 *a* (Chl.*a*) 浓度,培养至第 15 天时每个样本取 2 mL 藻液用鲁哥试剂固定,在 10×40 倍显微镜 (ZEISS AX10) 下,记录 50 根藻丝的长度和宽度以及异形胞的形态、长度和宽度. 同时采用针对 16S rDNA 设计的蓝藻特异性引物对 27FW 和 809R (表 1) 进行 PCR 扩增,PCR 产物送往公司测序,获得的序列采用 BLAST 进行相似性分析. 比生长速率  $\mu(\text{d}^{-1})$  指在某一时间段间隔内藻类的生长速率,计算公式<sup>[29]</sup>为:

$$\mu = [\ln(x_2) - \ln(x_1)] / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

式中,  $x_1$  为  $t_1$  时的生物量,  $x_2$  为  $t_2$  时的生物量,此处均为 Chl.*a* 浓度,  $\mu\text{g/L}$ . 而  $t_1$ 、 $t_2$  分别为拟柱孢藻指数生长期的第 1 天和第 7 天.

藻丝体的长宽比和比生长率差异采用多重比较分析 (Least-significant difference, LSD). 所有统计分析和图形绘制在 SPSS 22.0 和 OriginPro 8.0 软件中完成.

## 1.2 产毒基因的 PCR 扩增

选取拟柱孢藻毒素合成酶基因簇中的 *cyrA*、*cyrB*、*cyrC*、*cyrJ*、*pks* 和 *ps* 共 6 个基因,表 1 列举了 6 个基因的特异性引物序列和来源. 拟柱孢藻基因组 DNA 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 提取,PCR 反应体系总体积为 30  $\mu\text{L}$ ,包括:2×Hieff<sup>TM</sup> PCR Master Mix 15  $\mu\text{L}$ ,引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 3  $\mu\text{L}$ ,用无菌水补充体积. PCR 反应在 UNOH Biometra PCR 仪上进行,扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,SYBR 染色,BIO-RAD 凝胶成像系统检测,将有单一目标条带的 PCR 产物送往公司测序,获得的序列采用 BLAST 进行相似性分析.

表 1 用于 PCR 扩增的 16S rDNA、*rpoC1*、*nifH* 基因和产毒基因的引物信息

Tab.1 Detailed information of primers used for PCR amplification of 16S rDNA, *rpoC1*, *nifH* gene and toxigenic genes

基因名称	引物	引物序列 (5' - 3')	扩增片段大小	文献
16S rDNA	27FW	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	680 bp	[30]
	809R	GCTTCGGCACCAGGCTCGGGTCGATA		[30]
<i>nifH</i>	nifHf	TTCTCAATTACCCGACAGACG	297 bp	[21]
	nifHr	GCATACATCGCCATCATTTACACC		[21]
<i>rpoC1</i>	rpoC1F53	CACCAGAACGTATCCGCGCT	800 bp	[10]
	rpoC1F53	GGTGAATGACTGGAATGGCTGA		[10]
<i>cyrA</i>	CYLATF	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG	1105 bp	[31]
	CYLATR	TTAGGGAAGTAATCTTCACAG		[31]
<i>cyrB</i>	CPSF	AGTATATGTTGCGGACTCG	478 bp	[31]
	CPSR	CCCGCCAAGACAGAGGGTAG		[31]
<i>cyrC</i>	A205PKF	AATGACAGAGACTTGTGCGGGG	558 bp	[31]
	A205PKR	TTATCGGTATTGGTGCTAGCAACT		[31]
<i>cyrJ</i>	CynsulF	ACTTCTCTCCTTTCCTATC	578 bp	[12]
	CylnamR	GAGTGAAAATGCCTAGAACTTG		[12]
<i>ps</i>	M13	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC	597 bp	[32]
	M14	GATGGAACATCGCTCACTGCTG		[32]
<i>pks</i>	K18	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	422 bp	[33]
	M4	AATCCTTACGGGATCCGGTGC		[32]

### 1.3 CYN 的 LC-MS/MS 分析

取 2 mL 新鲜培养的拟柱孢藻藻液,离心后去上清,将藻细胞浸于纯净水中,冰浴下用超声波破碎仪破碎细胞,离心后收集上清,-20℃保存备用。上清中 CYN 的分析采用 AB SCIEX API 3200™ LC/MS/MS 系统,以纯度为 95% 的 CYN(Enzo life science)作为标准品。采集软件为 Analyst 1.6.2,离子源为 ESI 源,采用多反应监测(MRM)正离子模式,CYN 的定量离子对为 416.2/194.3 和 416.2/176.3,deoxy-CYN 的离子对为 400.2/194.3 和 400.2/176.3。色谱柱为安捷伦 Poroshell 120 EC-C18(4.6 mm×50 mm,2.7 μm),柱温为 40℃,进样量为 20 μL。液相色谱采用梯度模式洗脱,流速 0.6 mL/min,流动相为 5% 的乙腈。由于 deoxy-CYN 没有市售的标准品,它的定量根据 CYN 的标准曲线来计算。

### 1.4 序列比对与系统发育分析

*rpoC1* 基因是蓝藻中编码 RNA 聚合酶 3 个最大亚单位的基因,*nifH* 基因是固氮酶基因,是目前拟柱孢藻系统进化研究中最常使用的基因序列。用 10 株千灯湖拟柱孢藻的 *nifH* 和 *rpoC1* 序列与从 GenBank 数据库下载的同源序列构建系统树,两株念珠藻作为外类群,所用藻株的信息和来源见附表 1。采用 MEAGE6.0 对 42 株藻的 *nifH* 基因序列与 *rpoC1* 基因序列进行比对,删除首尾多余序列,将截取出来的序列保存。随后手动将同一株藻的两个基因序列在 Notepad++ 文本软件包中进行串联,串联序列长度为 628 bp。以串联序列为材料利用 iqtree 软件包构建系统发育树,程序中的 ModelFinder 模块自动计算出最大似然法(ML)的最佳拟合进化模型为 GTR+F+G4 模型。系统树各分支的置信度由重复抽样法(Bootstrap)1000 次重复检测。同时使用 MEGA6.0 构建最大简约(MP)进化树,以确定进化树的可靠性。进化树的编辑器使用 iTOL 的在线版本,链接为 <https://itol.embl.de/upload.cgi>。

## 2 结果

### 2.1 拟柱孢藻的形态和生长特性

将测序所获得的 QDH 系列藻株的 16S rDNA 基因序列与 GeneBank 数据库中的拟柱孢藻 16S rDNA 进行比对,序列相似性达到了 99.6%,表明在千灯湖分离到的 10 株丝状藻为拟柱孢藻。数据已上传至 NCBI 数据库,10 株藻的登录号为 MK617302~MK617311。

在正常的培养条件下,10 株拟柱孢藻的藻丝体形态均为笔直型(图 1),丝体长度范围在 41.0~77.7 μm 间,宽度范围在 2.433~3.125 μm 间,对 10 株藻株藻丝体的长宽比值做 LSD 分析(表 2),结果 QDH9 比值最大,为 31.491±12.867,除与 QDH2 和 QDH7 无差异外与其他藻株差异显著( $P<0.05$ ),QDH4 的比值最低,为 16.251±6.287。除 QDH1 藻株外,其他 9 株千灯湖拟柱孢藻均可产生端生异形胞,其形状如水滴、圆柱或圆锥。在培养过程中,厚壁孢子也可经常观察到,其位置主要有亚端生(如 QDH3、QDH4、QDH7 和 QDH9),双生以及顶端生(QDH5 为发育中的厚壁孢子)。

拟柱孢藻 QDH3 在培养的第 3 天在玻璃管底部可见大量黄色沉淀,第 6 天已经死亡。其他 9 株藻在整个培养周期内生长良好(图 2),在实验结束时,QDH1 生物量最高,QDH8 最低。对 9 株藻第 1~7 天的比生长速率做 LSD 分析表明(表 2),其中 QDH4 比生长速率藻株最高,为 0.174±0.009 d<sup>-1</sup>,除与 QDH2 无差异外与其他藻株均差异极显著( $P<0.001$ ),QDH7 的比生长速率最低,为 0.075±0.006 d<sup>-1</sup>,与其他藻株均差异极显著( $P<0.001$ )。

### 2.2 拟柱孢藻产毒能力分析

10 株拟柱孢藻均检测到 *cyrB* 和 *cyrC* 基因,而 *ps* 和 *pks* 基因只在 QDH7 和 QDH9 藻株中检出,仅 QDH7 藻株检测出 6 个基因(表 3)。LC-MS/MS 对毒素检测的结果表明,QDH7 藻株的毒素检测为阳性,其他 9 株拟柱孢藻均没有检出拟柱孢藻毒素,QDH7 藻株同时检出 CYN 和 deoxy-CYN 两种异构体,但异构体 CYN 浓度极低,deoxy-CYN 浓度极高,可达 1745.19 ng/mL(表 3)。

### 2.3 系统发育树分析

本研究利用 40 株(其中 10 株为本研究分离的藻株)来自不同大陆的拟柱孢藻和 2 株念珠藻(*Nostoc*)的双基因(*rpoC1* 和 *nifH*)序列来构建最大似然进化树(ML)与最大简约进化树(MP)。在 ML 进化树上(图 3),来自不同地区的 40 株拟柱孢藻聚类成 4 个类群:类群 I 只包含来自墨西哥的藻株,聚成了北美洲分支;

类群Ⅱ包括了新西兰的藻株,聚成了新西兰分支;来自乌干达和塞内加尔的藻株组成类群Ⅲ聚成了非洲分支;类群Ⅳ由来自中国的藻株和欧洲及澳大利亚藻株的组成,聚集成了澳大利亚/亚洲/欧洲分支,在该分支中中国藻株 QDH8、QDH4、CHAB2380 和 CHAB358 与来自德国、法国、澳大利亚的藻株聚集成一个亚类群。

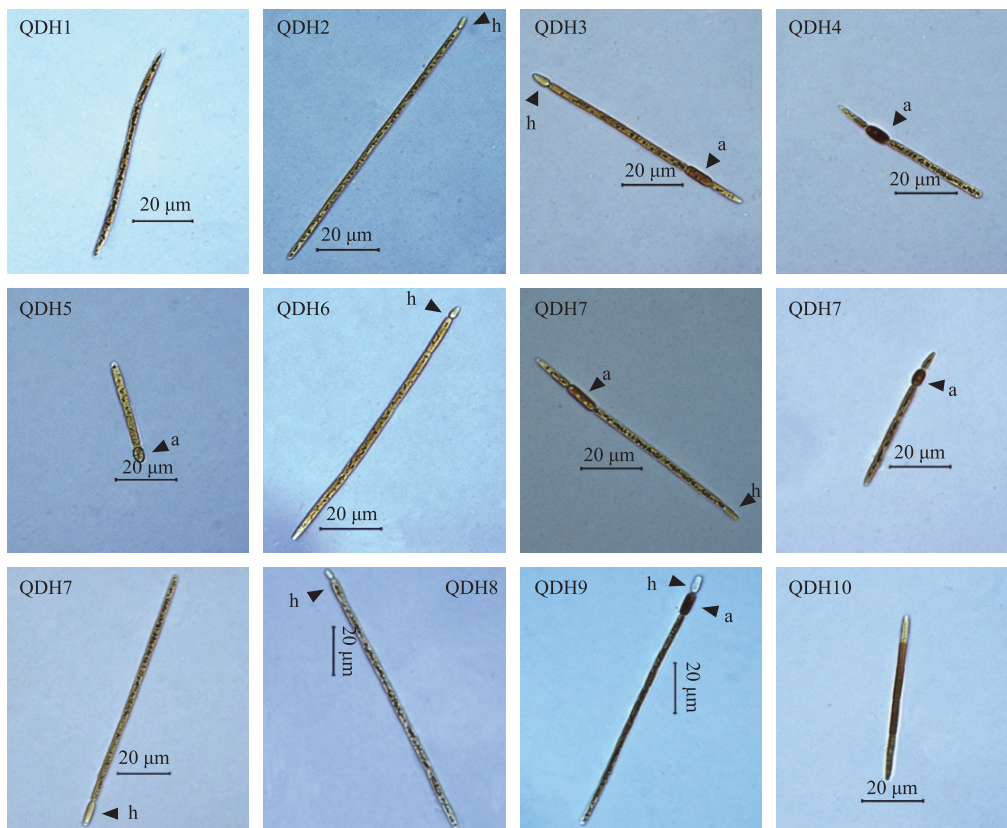


图 1 千灯湖拟柱孢藻株的形态特征(放大倍数为 10×40,a:厚壁孢子,h:异形胞)

Fig.1 Morphological characteristics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Qiandenghu Lake  
(The magnification is 10×40,a: akinete,h: heterocyst)

表 2 10 株拟柱孢藻的形态特征及比生长速率\*

Tab.2 Morphological characteristics and specific growth rate of ten strains of *Cylindrospermopsis raciborskii*

藻株	藻丝体				异形胞			比生长速率/d <sup>-1</sup>	
	长/μm	宽/μm	长:宽		长/μm	宽/μm	长:宽		
QDH1	68.750±22.588	2.900±0.155	23.691±7.487	b	—	—	—	0.120±0.002	b
QDH2	69.833±43.286	2.433 ±0.185	28.612±16.835	ab	8.958±1.740	3.667±0.649	2.488±0.524	0.162±0.090	a
QDH3	48.534±16.787	2.442±0.170	20.006±6.794	bc	7.146±1.310	3.333±0.758	2.203±0.438	—	—
QDH4	41.054±18.201	2.542±0.187	16.251±6.287	c	8.000±1.490	3.625±0.759	2.281±0.553	0.174±0.009	a
QDH5	59.583±32.204	3.042±0.208	19.634±10.771	bc	6.875±1.172	2.667±0.432	2.633±0.573	0.116±0.004	b
QDH6	53.858±17.313	3.125±0.127	17.194±5.371	c	6.425±1.246	2.633±0.339	2.456±0.490	0.113±0.013	b
QDH7	70.750±25.278	2.983±0.185	23.976±9.434	ab	7.958±1.752	2.958±0.613	2.733±0.521	0.075±0.006	c
QDH8	52.917±39.173	2.483±0.091	21.883±18.896	bc	5.658±2.114	2.467±0.109	2.300±0.870	0.107±0.005	b
QDH9	77.708±31.877	2.508±0.103	31.491±12.867	a	7.458±1.657	3.204±0.854	2.416±0.609	0.113±0.006	b
QDH10	57.292±25.136	3.000±0.186	19.033±8.064	bc	6.000±1.408	2.642±0.32	2.281±0.524	0.108±0.002	b

\* 藻丝体和异形胞长宽比值的检验水平为  $P<0.05$ , 比生长速率的检验水平为  $P<0.001$ , 表中 a、b 和 c 表示显著性差异。

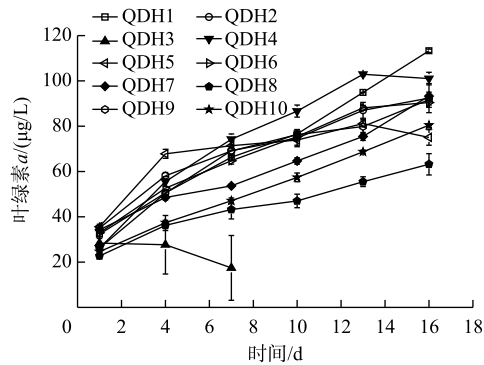


图 2 10 株千灯湖拟柱孢藻的生长曲线

Fig.2 Growth curves of ten strains of *Cyindrospermopsis raciborskii* from Qiandenghu Lake

表 3 千灯湖 10 株拟柱孢藻的产毒基因和拟柱孢藻毒素分析\*

Tab.3 Analysis of toxin genes and cylindrospermopsin in ten strains of *Cyindrospermopsis raciborskii* isolated from Qiandenghu Lake

藻株	cyrJ	cyrA	cyrB	cyrC	ps	pks	LC-MS/MS/( ng/mL)	
							CYN	deoxy-CYN
QDH1	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH2	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH3	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH4	+	—	+	+	—	—	—	—
QDH5	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH6	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH7	+	+	+	+	+	+	+	1745.19
QDH8	—	—	+	+	—	—	—	—
QDH9	+	—	+	+	+	+	—	—
QDH10	—	—	+	+	—	—	—	—

\* “+”代表阳性;“—”代表阴性.

CHAB 系列(除了 CHAB482)藻株形成一个分支. CHAB482 与 QDH 系列的其他藻株形成了一个亚类群. MP 树的分支情况与 ML 树一致,也分为 4 个大类群,分别为: I 北美洲、II 新西兰、III 非洲和 IV 澳大利亚/亚洲/欧洲,其中类群 IV 由两个并系类群组成(图未展示,Bootstrap 值添加于 ML 树中).

3 讨论

本研究发现在相同的培养条件下,千灯湖 10 株拟柱孢藻在生长速度、藻丝体长宽、产毒能力、厚壁孢子 and 异形胞的形成上存在差异,这与前人的研究基本一致<sup>[16-17,34-35]</sup>. 如 Willis 等从澳大利亚 Wivenhoe 湖采集的单个样品中分离到 24 株拟柱孢藻,发现这些藻株在生长特性、毒素含量和形态等方面均存在差异<sup>[17]</sup>;随后 Miotto 等从 Peri Lagoon 湖分离出两株拟柱孢藻,研究显示它们在温度、光照、不同营养盐下的形态、生长速度和毒素产量等方面存在差异<sup>[16]</sup>;Xiao 等研究了蓝藻对光照和温度的耐受,发现拟柱孢藻的种内差异甚至大于种间差异,表明拟柱孢藻具有高度的可塑性<sup>[35]</sup>. 另外,Yamamoto 和 Shiah 的研究显示同一池塘不同季节分离的拟柱孢藻在比生长速率和厚壁孢子的产生上差异显著<sup>[34]</sup>;Miotto 等同样发现 Peri Lagoon 湖的拟柱孢藻几乎全年都在浮游植物群落中保持优势地位,可能是因为不同生态型对环境的容忍度和偏好导致的<sup>[16]</sup>. 本研究分离的 10 株拟柱孢藻中,QDH1 藻株即使在缺氮的条件依然不形成异形胞,但 PCR 扩增可检测到 *nifH*



图 3 基于 41 株拟柱孢藻和 2 株念珠藻的 *rpoC1* 和 *nifH* 基因构建的系统发育树 (*Nostoc* sp. PCC6720 和 *Nostoc punctiforme* PCC73102 为外类群, 结点上分别为 ML 和 MP 的 Bootstrap 值)  
 Fig.3 Phylogenetic tree inferred from 41 strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* using two concatenated genes (*rpoC1* and *nifH*), with *Nostoc* sp. PCC6720 and *Nostoc punctiforme* PCC73102 as the outgroup, and the nodes were ML and MP Bootstrap values)

基因, 其序列与 NCBI 数据库中其他拟柱孢藻 *nifH* 基因的相似性达 99.4%, 这暗示着该藻株拥有固氮酶基因, 但异形胞形成相关的基因存在缺失, 已有研究表明异形胞的分化需要大量基因共同参与<sup>[36]</sup>. 从千灯湖分离的拟柱孢藻很容易产生厚壁孢子, 其他学者的研究中也观察到这种现象<sup>[34]</sup>, 一般认为厚壁孢子的产生是拟柱孢藻适应不良环境的结果, 这有利于该藻向温带地区入侵<sup>[20]</sup>.

目前共发现了 5 种拟柱孢藻毒素的同分异构体. 拟柱孢藻毒素 (CYN) 最为常见<sup>[2]</sup>, 其次为 deoxy-CYN<sup>[37]</sup>, 其他 3 种异构体则极少报道. 本研究中分离的千灯湖 10 藻株仅 QDH7 可产毒并且以 deoxy-CYN 异构体为主. 这与 Jiang 等的研究结果类似, 他们发现从我国多个水体分离的拟柱孢藻中产毒藻株比例极低, 其中有两藻株只产生 deoxy-CYN<sup>[10]</sup>, 因此推测我国的拟柱孢藻产毒的主要类型为 deoxy-CYN, 其次为 CYN.

拟柱孢藻毒素的合成需要多个基因的分工合作完成, 具有完整 *Cyr* 基因簇的藻株被认为是区分具产毒潜能与非产毒潜能藻株最明显的特征<sup>[12, 18]</sup>. 在本研究中, 只有 QDH7 藻株可完全检出 6 个基因, 其他 9 株拟柱孢藻只能检出 2~5 个基因, 经 LC-MS/MS 检测除 QDH7 外均不产毒, 这种产毒基因检测呈阳性但毒素分析为阴性的现象在前人的研究中比较常见<sup>[38-39]</sup>. 一些非产毒藻株出现部分产毒基因可能是因为产毒和不产毒蓝藻共存下水平基因转移或插入/删除所致<sup>[36, 18, 40-41]</sup>. Ballot 等在多株非产毒束丝藻中检测到 *cyrA*、*cyrB* 和 *cyrC*, 认为 *cyrJ* 才能较好的指示毒性潜能<sup>[38]</sup>. 在我们的研究中, 非产毒藻株 QDH4 和 QDH9 也有 *cyrJ* 基因, 但是测序对比分析发现这两株藻的 *cyrJ* 基因均缺失了 6 个碱基 (未发表的结果), 而 Jiang 等发现 *cyrJ* 存在 3

种基因类型,可产生 CYN 的藻株 *cyrJ* 基因大多数属于 Jtype2a,而我们的 QDH4 和 QDH9 是属于 Jtype2c<sup>[10]</sup>,这种缺失是否影响到 *cyrJ* 的表达尚不清楚,因此 *cyrJ* 基因的指示作用还有待进一步考证。

在探讨世界范围内拟柱孢藻的系统进化和起源时,有研究认为多个遗传标记的共建树比单个遗传标记的区分能力更强大<sup>[22,42]</sup>;例如 Haande 等发现 *pc-IGS*、*nifH*、ITS-L 和 *rpoC1* 等单个基因建树不能区分澳大利亚、非洲和欧洲的藻株,但 4 个遗传标记共建树能够将非洲、澳大利亚、欧洲和美洲的藻株完全区分<sup>[22]</sup>,因此本研究选择两个遗传标记基因 *nifH* 和 *rpoC1* 共建系统发育树。结果表明澳大利亚、亚洲和欧洲藻株具有更高的同源性,这与前人的研究结果基本一致<sup>[24,43-45]</sup>。根据 Padisák 的研究,认为最近拟柱孢藻的入侵是由澳大利亚扩散至亚洲然后再扩散至欧洲,从本文构建的两株双基因系统进化树来看,结果更接近 Padisák 的假说,推测中国的拟柱孢藻是来自于澳大利亚株系的扩散(图 3)。产毒藻株 QDH7 和其他几株非产毒藻株聚集在一起,表明了它们具有高度的同源性,这表明常规的遗传标记基因难以区分产毒和非产毒株系<sup>[18]</sup>。

#### 4 结论

同一水体分离的拟柱孢藻株系在生长特性、形态特征和产毒能力上存在显著差异,即具有多个生态型。从 10 株拟柱孢藻产毒能力的结果可以看出,千灯湖中的拟柱孢藻以非产毒株占优势,产毒拟柱孢藻以产 deoxy-CYN 异构体为主。系统进化分析表明,千灯湖的拟柱孢藻与中国其他地区,澳大利亚以及欧洲的藻株同源性较高,千灯湖产毒株与非产毒株聚集在同一支,基于 *nifH* 和 *rpoC1* 等常规遗传标记基因构建的系统树不能区分产毒株与非产毒株。

#### 5 参考文献

- [1] Byth S. Palm Island mystery disease. *The Medical Journal of Australia*, 1980, **2**(1): 40-42.
- [2] Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cyindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, **114**(20): 7941-7942. DOI: 10.1002/chin.199303263.
- [3] Humpage AR, Fenech M, Thomas P *et al.* Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cyindrospermopsin. *Mutation Research*, 2000, **472** (1/2): 155-161. DOI: 10.1016/s1383-5718(00)00144-3.
- [4] Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC *et al.* Cyindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**(4): 243-251. DOI: 10.1002/tox.10121.
- [5] Neumann C, Bain P, Shaw G. Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *Journal of Toxicology & Environmental Health*, 2007, **70** (19): 1679-1686. DOI: 10.1080/15287390701434869.
- [6] Humpage A, Falconer I. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*, 2010, **18** (2): 94-103. DOI: 10.1002/tox.10104.
- [7] Sinha R, Pearson LA, Davis TW *et al.* Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones-Is climate change responsible? *Water Research*, 2012, **46**(5): 1408-1419. DOI: 10.1016/j.watres.2011.12.019.
- [8] Wood SA, Stirling DJ. The First identification of the cyindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2003, **37**(4): 821-828. DOI: 10.1080/00288330.2003.9517211.
- [9] Li R, Carmichael WW, Brittain S *et al.* The first report of the cyanotoxins cyindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 2001, **37**(6): 1121-1126. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.01075.x.
- [10] Jiang Y, Xiao P, Yu G *et al.* Sporadic distribution and distinctive variations of cyindrospermopsin genes in cyanobacterial strains and environmental samples from Chinese freshwater bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80** (17): 5219-5230. DOI: 10.1128/AEM.00551-14.
- [11] Lei L, Peng L, Huang X *et al.* Occurrence and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* and dissolved cyindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply, South China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, **186**



- (5): 3079-3090. DOI: 10.1007/s10661-013-3602-8.
- [12] Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J *et al.* Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**: 716-722. DOI: 10.1128/AEM.01988-07.
- [13] Moreira C, Azevedo J, Antunes A *et al.* Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, **114**(3): 605-620. DOI: 10.1111/jam.12048.
- [14] Bonilla S, Aubriot L, Soares MCS *et al.* What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, **79**(3): 594-607. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x.
- [15] Chonudomkul D, Yongmanitchai W, Theeragool G *et al.* Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **48**(3): 345-355. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.02.014.
- [16] Miotto MC, Costa LDF, Brentano DM *et al.* Ecophysiological characterization and toxin profile of two strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from a subtropical lagoon in Southern Brazil. *Hydrobiologia*, 2017, **802**(1): 97-113. DOI: 10.1007/s10750-017-3243-y.
- [17] Willis A, Chuang AW, Woodhouse JN *et al.* Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Toxicon*, 2016, **119**: 307-310. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.07.005.
- [18] Sinha R, Pearson LA, Davis TW *et al.* Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics*, 2014, **15**(1): 83-96. DOI: 10.1186/1471-2164-15-83.
- [19] Wilmotte A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. *Molecular Biology of Cyanobacteria*, 1994, **1**: 1-25. DOI: 10.1007/978-94-011-0227-8\_1.
- [20] Padisák J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its. *Arch für Hydrobiol Suppl Monogr*, 1997, **107**: 563-593.
- [21] Gugger M, Molica R, Le BB *et al.* Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol*, 2005, **71**: 1097-1100. DOI: 10.1128/AEM.71.2.1097-1100.2005.
- [22] Haande S, Rohrlack T, Ballot A *et al.* Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, 2008, **7**: 692-701. DOI: 10.1016/j.hal.2008.02.010.
- [23] Cirés S, Wörmer L, Ballot A *et al.* Phylogeography of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxin-producing Nostocales cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80**: 1359-1370.
- [24] Manthos P, Sevasti-Kiriaki Z, Triantafyllos K *et al.* A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: Missing link in tropic invader's phylogeography tale. *Harmful Algae*, 2018, **80**: 96-106. DOI: 10.1016/j.hal.2018.10.002.
- [25] Wu Z, Shi J, Xiao P *et al.* Phylogenetic analysis of two cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* based on multi-gene sequences. *Harmful Algae*, 2011, **10**(5): 419-425. DOI: 10.1016/j.hal.2010.05.001.
- [26] Yamamoto Y, Shiah FK, Hsu SC. Seasonal variation in the net growth rate of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a shallow artificial pond in northern Taiwan. *Plankton and Benthos Research*, 2013, **8**(2): 68-73. DOI: 10.3800/pbr.8.68.
- [27] Xie JL, Yu GL, Xu XD *et al.* The morphological and molecular detection for the presence of toxic *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria) in Beijing city, China. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, **36**(2): 1-10.
- [28] Zhao L, Lei LM, Peng L *et al.* Seasonal dynamic and driving factors of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Zhenhai Reservoir, Guangdong Province. *J Lake Sci*, 2017, **29**(1): 193-199. DOI: 10.18307/2017.0121.[赵莉, 雷腊梅, 彭亮等. 广东省镇海水库拟柱胞藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)的季节动态及驱动因子分析. 湖泊科学, 2017, **29**(1): 193-199.]
- [29] Baker ET, Lavelle JW. The effect of particle size on the light attenuation coefficient of natural suspensions. *Journal of Geophysical Research Oceans*, 1984, **89**(C5). DOI: 10.1029/JC089iC05p08197.
- [30] Jungblut AD, Hawes I, Mountfort D *et al.* Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(4): 519-529. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00717.x.
- [31] Kellmann R, Mills T, Neilan BA. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, **62**(3): 267-280. DOI: 10.1007/s00239-005-0030-6.
- [32] Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindro-*

- spermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 2001, **16**(5): 413-421. DOI: 10.1002/tox.1051.
- [33] Fergusson KM. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**(2): 120-125. DOI: 10.1002/tox.10108.
- [34] Yamamoto Y, Shiah FK. Growth, trichome size and akinete production of *Cylindrospermopsis raciborskii*, (cyanobacteria) under different temperatures: Comparison of two strains isolated from the same pond. *Phycological Research*, 2014, **62**(2): 147-152. DOI: 10.1111/pre.12040.
- [35] Xiao M, Willis A, Burford MA. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. *Harmful Algae*, 2017, **62**: 84-93. DOI: 10.1016/j.hal.2016.12.008.
- [36] Stucken K, John U, Cembella A *et al.* The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: Comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE*, 2010, **5**(2): e9235. DOI: 10.1371/journal.pone.0009235.
- [37] Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G *et al.* Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*, 1999, **14**: 163-165.
- [38] Ballot A, Ramm J, Rundberget T *et al.* Occurrence of non-cylindrospermopsin-producing *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena bergii* in Lake Kinneret (Israel). *Journal of Plankton Research*, 2011, **33**: 1736-1746.
- [39] Fathalli A, Jenhani ABR, Moreira C *et al.* Genetic variability of the invasive cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* from Bir M'cherga reservoir (Tunisia). *Arch Microbiol*, 2011, **193**: 595-604.
- [40] Christiansen G, Molitor C, Philmus B *et al.* Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**: 1695-1704. DOI: 10.1093/molbev/msn120.
- [41] Moustafa A, Loram JE, Hackett JD *et al.* Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS ONE*, 2009, **4**: 57-58. DOI: 10.1371/journal.pone.0005758.
- [42] Moreira C, Fathalli A, Vasconcelos V *et al.* Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch Microbiol*, 2015, **197**: 47-52. DOI: 10.1007/s00203-014-1052-5.
- [43] Dyble J, Paerl HW, Neilan BA. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpeBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, **68**(5): 2567-2571. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2567-2571.2002.
- [44] Neilan BA, Saker ML, Fastner J *et al.* Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol Ecol*, 2003, **12**: 133-140. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01709.x.
- [45] Moreira C, Fathalli A, Vasconcelos V *et al.* Genetic diversity and structure of the invasive toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Current Microbiology*, 2011, **62**(5): 1590-1595. DOI: 10.1007/s00284-011-9900-x.
- [46] Wood SA, Pochon X, Luttringer-Plu L *et al.* Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae*, 2014, **39**: 64-74. DOI: 10.1016/j.hal.2014.06.013.
- [47] Saker ML ed. Cyanobacterial blooms in tropical north Queensland water bodies. Townsville: Thesis, James Cook University, 2000.
- [48] Mevarech M, Haselkorn RR. [Part 2; Biological Sciences] || Nucleotide Sequence of a Cyanobacterial *nifH* Gene Coding for Nitrogenase Reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, **77**(11): 6476-6480. DOI: 10.2307/9579.

附录 I 本文所用的拟柱孢藻藻株的来源和登录号

Appendix I Geographic location and author of the *Cylindrospermopsis raciborskii* strains used in this study and the GenBank accession numbers

藻株	<i>rpoC1</i> 登录号	<i>nifH</i> 登录号	藻株来源	参考文献
PMC98.14	AJ582286	AJ582094	France ( Europe )	[ 21 ]
PMC99.12	AJ582287	AJ582095	France ( Europe )	[ 21 ]
PMC99.08	AJ582289	AJ582098	Mexico ( Nortn America )	[ 21 ]
PMC117.02	AJ582092	AJ582100	Guiers, Senegal ( Africa )	[ 21 ]
PMC118.02	AJ582091	AJ582099	Guiers, Senegal ( Africa )	[ 21 ]
NIVA-CYA 506	AM502050	AM502059	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
NIVA-CYA 507	AM502051	AM502060	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
NIVA-CYA 508	AM502052	AM502061	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
NIVA-CYA 509	AM502053	AM502062	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
NIVA-CYA 510	AM502054	AM502063	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
NIVA-CYA 511	AM502055	AM502064	Kazinga Channel, Uganda ( Africa )	[ 22 ]
ZIE05CR	AM502056	AM502065	Zierker See, Germany ( Europe )	[ 22 ]
ZIE11CR	AM502057	AM502066	Zierker See, Germany ( Europe )	[ 22 ]
ZIE13CR	AM502058	AM502067	Zierker See, Germany ( Europe )	[ 22 ]
CHAB2380	FJ890605	FJ890677	Shiyan Reservoir, Guangdong( China )	[ 25 ]
CHAB2379	FJ890601	FJ890688	Shiyan Reservoir, Guangdong( China )	[ 25 ]
CHAB353	FJ890597	FJ890679	Wenshanhu lake, Guangdong( China )	[ 25 ]
CHAB358	FJ890607	FJ890684	Wenshanhu lake, Guangdong( China )	[ 25 ]
CHAB359	FJ890680	FJ890680	Wenshanhu lake, , Guangdong( China )	[ 25 ]
CHAB155	FJ890599	FJ890682	Fish pond, Yunnan( China )	[ 25 ]
CHAB151	FJ890600	FJ890683	Fish pond, Yunnan( China )	[ 25 ]
CHAB1336	FJ890604	FJ890685	Nanhu Lake, Hubei( China )	[ 25 ]
CHAB481	FJ890602	FJ890686	Nanhu Lake, Hubei( China )	[ 25 ]
CHAB482	FJ890596	FJ890678	Nanhu Lake, , Hubei( China )	[ 25 ]
MM71	HC942520	HC942514	Lake Whangape, New Zealand	[ 46 ]
MM77	HC942521	HC942515	Lake Whangape, New Zealand	[ 46 ]
MM69	HC942519	HC942513	Lake Whangape, New Zealand	[ 46 ]
MM67	HC942518	HC942512	Lake Whangape, New Zealand	[ 46 ]
MM65	HC942517	HC942511	Lake Waikare, New Zealand	[ 46 ]
MM48	HC942516	HC942510	Lake Waikare, New Zealand	[ 46 ]
CS-506	—	—	North Queensland, Australia	[ 47 ]
CS-510	—	—	North Queensland, Australia	[ 47 ]
QDH1	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH2	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH3	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH4	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH5	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH6	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH7	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH8	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH9	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
QDH10	—	—	Qiandeng lake, Guangdong( China )	This Study
<i>Nostoc</i> sp. PCC6720	MG461377	Z31716	—	Szefel-Markowska/ [ 48 ]
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	MG461368	AY768412	—	Szefel-Markowska/ Barrios-Llerena