

广东省水库微囊藻的产毒特征和ITS序列的遗传多样性分析

李春连, 辛艳萍, 韩博平, 雷腊梅*

(暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

摘要: 为了解广东省水库微囊藻的产毒特征和 ITS 序列的遗传多样性, 从广东省供水水库中分离得到 28 株微囊藻(*Microcystis* spp.), 对它们的产毒特征和 15 株微囊藻的 ITS 序列进行了分析。高效液相色谱(HPLC)和微囊藻毒素合成酶基因 *mcyE* 的检测结果表明, 广东省水库中的微囊藻以产毒藻株占优势, 微囊藻毒素的主要类型为 MC-RR。广东省 15 株藻株的 ITS 序列相似性大于 93.2%, 在用相邻法(NJ)构建的系统树上, 不同形态的种和不同地理区域的藻株没有区分开, 产毒和非产毒藻株没有形成独立分支。这说明微囊藻 ITS 序列的遗传多样性较低, ITS 序列和 *mcyE* 存在没有相关性, 表型不能够反映藻株的进化关系。因此, 有必要将藻类传统分类方法与分子方法结合起来对蓝藻进行重新分类。

关键词: 微囊藻; ITS; 水库; 产毒特征; 广东省

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.04.005

ITS Sequences Analysis and Toxin Characteristic of *Microcystis* Strains Isolated from Guangdong Reservoirs

LI Chun-lian, XIN Yan-ping, HAN Bo-ping, LEI La-mei*

(Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to understand the toxin characteristics and ITS sequences diversity of *Microcystis* in Guangdong reservoirs, twenty-eight *Microcystis* strains were isolated, and their toxin characters and ITS sequences obtained from fifteen *Microcystis* strains were analyzed. The results showed that microcystin-producing genotypes were dominated in Guangdong reservoirs by HPLC and PCR method of microcystin synthase gene (*mcyE*), and the main type of microcystin was MC-RR. ITS sequences of *Microcystis* strains from Guangdong reservoirs had more than 93.2% similarity. Neighbour-joining (NJ) tree indicated that different species and origin from different regions could gather in a group, and toxic and non-toxic strains could not be separated. It was suggested that genetic diversity of *Microcystis* strains in Guangdong reservoirs was low, and there were no correlation between ITS sequences and the presence of *mcyE*. Furthermore, phenotypes of *Microcystis* strains did not necessarily reflect their phylogeny. So the combination of traditional and molecular approaches required to reassess the current cyanobacterial taxonomy should become the focus in the future.

Key words: *Microcystis*; ITS; Reservoirs; Toxic characteristic; Guangdong Province

微囊藻(*Microcystis* spp.)是世界范围内富营养化水体中最常见的种类之一。该藻能产生一类环

状七肽的肝毒素——微囊藻毒素(MCs), MCs 能够抑制蛋白磷酸酶 1 和 2A, 使细胞结构过度磷酸化。

收稿日期: 2012-08-24 接受日期: 2013-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070416); 广东省水利厅中小型水库蓝藻水华研究项目资助

作者简介: 李春连(1986~), 女, 硕士研究生, 研究方向为水污染与供水安全。E-mail: 100com.5-77@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tleilam@jnu.edu.cn

研究表明,该毒素是一种强烈的促癌剂,长期饮用含有微囊藻毒素的水可引发肝损伤甚至肝癌^[1],严重危害人类健康。因此,微囊藻的产毒特征一直备受关注^[2-3]。为保障供水安全,很多国家均对饮用水体中的微囊藻毒素浓度进行了限定,我国参考WHO的标准,规定生活饮用水中微囊藻毒素浓度的限制值为 $1\ \mu\text{g L}^{-1}$ 。

微囊藻属的常规分类主要是根据细胞大小、细胞形态、胶被特征、菌落形态和结构等形态特征进行区分^[4]。但以形态特征为主要分类依据的方法仍存在一些不足^[5],因为在自然界中微囊藻表型存在一些过渡类型或者在实验室培养下表型会发生改变^[6]。随着分子生物学的发展,分子遗传分析方法逐渐成为蓝藻分类的重要辅助工具。16S-23S ITS (Internal transcribed spacer sequences)序列被认为选择压力较少,在基因序列和序列长度中变化明显^[7-8]。用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)研究蓝藻 rRNA 操纵子的结果也表明 16S-23S ITS 在序列和长度上差异较大^[9]。有研究报道认为用 16S-23S ITS 序列来分析物种间的分化较为可靠^[7]。国外对微囊藻的 ITS 基因序列分析已有较多研究^[5,10],国内章群等^[11-13]对微囊藻的 16S rRNA 序列、*gyrB* 基因和 PC-IGS 序列进行了研究;王捷等^[14]和陈月^[15]分别对太原和武汉地区的微囊藻 ITS 序列进行了研究,但有关广东省水库的微囊藻 ITS 序列的研究报道较少。而广东省地处热带、亚热带季风气候区,季度降雨量不均衡,全省有三分之一的用水量是由水库供给,水库水质在广东省及港澳地区的工农业生产中起着十分重要的作用,但近 10 年来,水库的富营养化趋势明显,以微囊藻为主的蓝藻水华频繁发生^[16],严重影响了水库的供水功能。因此,本文对广东省水库 28 株微囊藻的产毒状况以及 15 株微囊藻藻株的 ITS 序列进行了研究,结合 GenBank 中的同源序列探讨了这

些藻株形态特征与系统进化的关系,表型与基因型的相关性,通过形态种的识别是否能够对有毒水华提供预警,为后期微囊藻水华的检测预防、微囊藻分类和遗传多样性研究等工作提供参考。

1 材料和方法

1.1 藻株的分离和培养

从广东省的 11 座水库中采取水样,在显微镜下挑取单个微囊藻群体,无菌水洗 3~5 次,转至装有 2~3 mL 已灭菌的 BG-11 培养基中,置于 25℃ 恒温光照培养箱中培养,4 周左右可见扩大生长的蓝绿色微囊藻漂浮在培养基中,转移至锥形瓶中继续培养。共计分离出微囊藻 28 株,有 4 个形态种,分别为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、水华微囊藻(*M. flos-aquae*)、惠氏微囊藻(*M. wesenbergii*)和绿色微囊藻(*M. viridis*)。

1.2 基因组DNA提取

离心收集微囊藻细胞,用上海博彩生物科技有限公司生产的 3S 基因组 DNA 试剂盒来提取总的基因组 DNA。

1.3 引物序列及反应体系

PCR 引物序列如表 1^[7,17], 50 μL 的 PCR 反应体系包含: $10\times$ PCR buffer 5 μL , 引物各 0.5 μL (浓度为 20 pmol μL^{-1}), $1\times$ dNTP 4 μL (浓度为 2.5 mmol μL^{-1}), *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL (浓度为 1 U μL^{-1}), DNA 模板 5 μL (20~30 ng μL^{-1}), 用灭菌水补足体积。F2/R8 引物的反应条件为: 94℃ 3 min; 接着 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保存。16S rDNA 引物的反应条件为: 94℃ 3 min; 接着 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保存。PCR

表 1 ITS 和 *mcyE* 的引物序列

Table 1 Primers for ITS and *mcyE* of *Microcystis* strains

	引物 Primer	序列 Sequence	产物大小 Size of product (bp)
ITS	MSR-S2f	5'-TCAGGTTGCTTAACGACCTA-3'	360
	242r	5'-(G/T)TTCGCTCGCC(A/G)CTAC-3'	
<i>mcyE</i>	F2	5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3'	247
	R8	5'-CAATGGGAGCATAACGAG-3'	

反应在 UNOII Biometra PCR 仪中进行, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 在 BIO-RAD 凝胶成像系统上检测。

1.4 序列测定及分析

PCR 产物送至上海英骏公司割胶纯化和测序, 所测序列经人工校对后, 用 Clustal \times 1.83 进行序列处理, 得到 15 株微囊藻株的 ITS 序列, 结合从 GenBank 数据库下载的 19 株微囊藻的 ITS 序列, 使用 MEGA 5.0 的 Kimura-2-parameter 模型构建邻接树 (Neighbour-Joining, NJ), 以集胞藻属 (*Synechococcus*) PCC6803 (GenBank 序列号: BA000022.2) 为外类群, 系统树各分支的置信度由重复抽样法 (Bootstrap) 1000 次重复检测。

1.5 藻株中微囊藻毒素的测定

离心收集新鲜藻细胞, 加入 5% 乙酸浸泡 5 min, 后用磁力搅拌器搅拌 30 min, 接着在 $6000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液。沉淀物再经 75% 的甲醇提取两次, 所得上清液在真空浓缩蒸馏器中干燥, 剩余物用 5% 的乙酸溶解, 溶解物通过预先处理过的 Sep-Pak C18 小柱, 收集到的洗脱液用氮气吹干后, 用 1 mL 甲醇溶解定容, 并用 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器过滤到进样瓶中, 4°C 下保存。

微囊藻毒素 (MCs) 的测定采用高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 来检测, 检测方法参考 Kaya 和 Sano^[18], 微囊藻毒素标准样品 (MC-RR 和 MC-LR) 购自 Sigma 公司。所用色谱柱为 Water SPE ODS 柱子 ($4.6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$), 流动相为甲醇: 0.05 mol L^{-1} 磷酸缓冲液 (60:40), pH 3.0, 检测波长为 239 nm, 流速为 0.8 mL min^{-1} , 柱温为 25°C 。

2 结果和分析

2.1 产毒特征分析

从广东省 11 座水库分离培养的 28 株微囊藻藻株中有 14 株铜绿微囊藻、5 株水华微囊藻、5 株惠氏微囊藻和 3 株绿色微囊藻。以 F2/R8 为引物扩增微囊藻毒素合成酶基因 *mcyE*, 有 25 株微囊藻能够扩增出目的片段, 阳性检出率达到 89.3%, 而 SK21、SK10 和 SK20 这 3 株没有检测到目的产物。经 HPLC 检测, 有 25 株微囊藻能检测到微

囊藻毒素 (MCs), SK21、SK10 和 SK20 这 3 株微囊藻没有检测到 MCs, 与 PCR 结果完全一致 (表 2)。说明了广东省水库中的微囊藻主要由产毒种类组成, 而 F2/R8 引物在用于广东省微囊藻产毒特性的鉴别上是可信的。

分离藻株的微囊藻毒素 (MCs) 的浓度为 $12.4 \sim 982.3 \mu\text{g g}^{-1}$, 平均值为 $267.1 \mu\text{g g}^{-1}$ 。水库水样的微囊藻毒素浓度为 $157.9 \sim 2478.9 \mu\text{g g}^{-1}$, 平均为 $553.4 \mu\text{g g}^{-1}$ (数据没列出)。这表明水库水样的毒素浓度比分离藻株毒素浓度高。在分离藻株中铜绿微囊藻 SK28 的 MCs 浓度最高, 达到 $982.3 \mu\text{g g}^{-1}$, 其次为铜绿微囊藻 SK9, 浓度达到 $93.2 \mu\text{g g}^{-1}$ 。24 株微囊藻检测到微囊藻毒素 MC-RR, 6 株微囊藻检测到 MC-LR, 有 5 株微囊藻同时检测出 MC-RR 和 MC-LR。MC-RR 浓度为 $12.4 \sim 982.3 \mu\text{g g}^{-1}$, 平均为 $245.3 \mu\text{g g}^{-1}$; MC-LR 浓度为 $19.4 \sim 245.8 \mu\text{g g}^{-1}$, 平均为 $131.8 \mu\text{g g}^{-1}$ 。可知, 在广东省水库中微囊藻毒素 MC-RR 浓度普遍比 MC-LR 浓度高, 并且 MC-RR 为广东省水库水体中主要的微囊藻毒素类型。

2.2 系统树分析

15 株微囊藻的 PCR 扩增产物为 16S-23S ITS, 产物的序列长度为 360 bp 左右, 其中包括长度为 73 bp 的 tRNA-Ile。15 株藻株分别属于铜绿微囊藻、水华微囊藻、惠氏微囊藻和绿色微囊藻 4 个不同的形态种。用本实验 15 株 SK 系列藻株的 ITS 序列与从 GenBank 数据库下载的同源序列构建系统树 (表 3)。在 NJ 进化树上 (图 1), 来自不同地区的 30 株微囊藻聚类成 Clade 1, Clade 1 以外的 4 株藻株又形成不同分支。Clade 1 由 A、B 和 C 等 3 个亚群组成。从图 1 可知不同表型的微囊藻没有单独形成独立分支, 而是分散在 3 个亚群当中, 15 株 SK 系列微囊藻的 ITS 序列相似性达到 93.2% 以上。A 亚群包含了从广东省水库分离的 10 株 SK 藻株和分别来自中国湖北、法国和日本的藻株 *Microcystis* sp. CTL、*M. aeruginosa* 843、*M. wesenbergii* NIES111, 藻株 ITS 序列相似度达到 97.2% 以上。B 亚群包含了来自日本、中国的藻株。产毒的 SK 序列藻株与 *M. aeruginosa* TAC71 和不产毒的藻株 *M. viridis* TAC17、*M. viridis* TAC44、*M. wesenbergii* NIES104 并没有分开。剩下的 3 株 SK 藻株和来自不同地理区域, 如法国、新西兰、罗马尼亚、日本、比利时等国家不同表现型的藻株聚集成

C 亚群, ITS 序列相似性达到 95% 以上。从上面的分析可知, 广东省水库不同表型的微囊藻藻株的 ITS 序列相似性较高, 没有明显的遗传差异。同时,

来自不同地理区域不同表型的微囊藻藻株遗传多样性较低, 产毒和非产毒微囊藻藻株在系统树上没有分开。

表 2 分离藻株的 PCR 和 HPLC 检测结果

Table 2 PCR and HPLC results of isolated strains

藻种 Species	取样水库 Sampling reservoir	F2/R8	MC-RR ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MC-LR ($\mu\text{g g}^{-1}$)	合计 Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
铜绿微囊藻 <i>Microcystis aeruginosa</i>					
SK1	大沙河水库 Dashanghe	+	32.6	-	32.6
SK2	大镜山水库 Dajingshan	+	12.4	-	12.4
SK27	南屏水库 Nanping	+	312.4	-	312.4
SK9	大沙河水库 Dashanghe	+	932	-	932
SK23	流溪河水库 Liuxihe	+	16.8	-	16.8
SK19	汤溪水库 Tangxi	+	123.6	19.4	143
SK28	大镜山水库 Dajingshan	+	982.3	-	982.3
SK11	大镜山水库 Dajingshan	+	45.7	32.4	78.1
SK8	汤溪水库 Tangxi	+	215.4	125.6	341
SK3	南屏水库 Nanping	+	32.1	-	32.1
SK7	大镜山水库 Dajingshan	+	24.1	-	24.1
SK13	大镜山水库 Dajingshan	+	236.8	-	236.8
SK17	大沙河水库 Dashanghe	+	32.6	-	32.6
SK14	大镜山水库 Dajingshan	+	236.8	-	236.8
水华微囊藻 <i>M. flos-aquae</i>					
SK5	大镜山水库 Dajingshan	+	362.4	-	362.4
SK24	显岗水库 Xian'gang	+	27.2	-	27.2
SK15	凤凰山水库 Fenghuangshan	+	124.5	245.8	370.3
SK10	大沙河水库 Dashanghe	-	-	-	-
SK6	大镜山水库 Dajingshan	+	356	-	356
惠氏微囊藻 <i>M. wesenbergii</i>					
SK26	显岗水库 Xian'gang	+	88.7	-	88.7
SK4	观洞水库 Guandong	+	712.5	-	712.5
SK22	高州水库 Gaozhou	+	477.2	122.7	599.9
SK20	大镜山水库 Dajingshan	-	-	-	-
SK21	新丰江水库 Xinfengjiang	-	-	-	-
绿色微囊藻 <i>M. viridis</i>					
SK25	高州水库 Gaozhou	+	145.3	-	145.3
SK12	观洞水库 Guandong	+	-	244.7	244.7
SK16	大沙河水库 Dashanghe	+	234.7	-	234.7
微囊藻属 <i>Microcystis</i> spp.					
SK18	大镜山水库 Dajingshan	+	122	-	122

+: 阳性; -: 阴性。

+: Positive; -: Negative.

表 3 用于构建系统进化树的微囊藻藻株的种类与来源

Table 3 Species and source of *Microcystis* used in NJ tree

藻种 Species	序列长度 Sequence length (bp)	登录号 Accession No.	来源 Source	毒素 Microcystin
<i>铜绿微囊藻 Microcystis aeruginosa</i>				
SK1	358	KC484682	本实验室 Our lab	+
SK7	358	KC484685	本实验室 Our lab	+
SK8	358	KC484686	本实验室 Our lab	+
SK13	358	KC484687	本实验室 Our lab	+
SK14	358	KC484688	本实验室 Our lab	+
SK23	358	KC484693	本实验室 Our lab	+
SK27	358	KC484695	本实验室 Our lab	+
SK28	358	KC484696	本实验室 Our lab	+
843	357	EU868600.1	法国 France	未知 Unkown
TAC71	360	AB015362	日本 Japan	+
TAC86	360	AB015363	日本 Japan	+
<i>水华微囊藻 M. flos-aquae</i>				
SK5	358	KC484684	本实验室 Our lab	+
SK24	358	KC484694	本实验室 Our lab	+
<i>惠氏微囊藻 M. wesenbergii</i>				
SK4	358	KC484683	本实验室 Our lab	+
SK21	358	KC484691	本实验室 Our lab	-
SK22	358	KC484692	本实验室 Our lab	+
NIES104	360	AB015387	日本 Japan	-
NIES111	360	AB015388	日本 Japan	-
<i>绿色微囊藻 M. viridis</i>				
SK16	358	KC484689	本实验室 Our lab	+
TAC17	360	AB015398	日本 Japan	+
TAC44	360	AB015399	日本 Japan	+
<i>微囊藻属 Microcystis spp.</i>				
SK18	358	KC484690	本实验室 Our lab	+
CTL	359	HQ855154.1	太湖 Taihu	未知 Unkown
X525	396	JN210491.1	湖北 Hubei	未知 Unkown
T1-4	355	AB015359	泰国 Thailand	未知 Unkown
Q333	365	HQ714115.1	秦淮河 Qinhuaihe River	未知 Unkown
T34-5	358	EF634469.1	新西兰 New Zealand	未知 Unkown
NT1	358	FJ830620.1	比利时 Belgium	未知 Unkown
Brown	358	AY333417.1	以色列 Israel	未知 Unkown
<i>挪氏微囊藻 M. novacekii</i>				
BC18	360	AB015377	英国 England	-
TAC20	360	AB015374	日本 Japan	-
<i>鱼害微囊藻 M. ichthyoblabe</i>				
TC9	360	AB015373	泰国 Thailand	-
TAC48	360	AB015366	日本 Japan	-

+: 阳性; -: 阴性。

+: Positive; -: Negative.

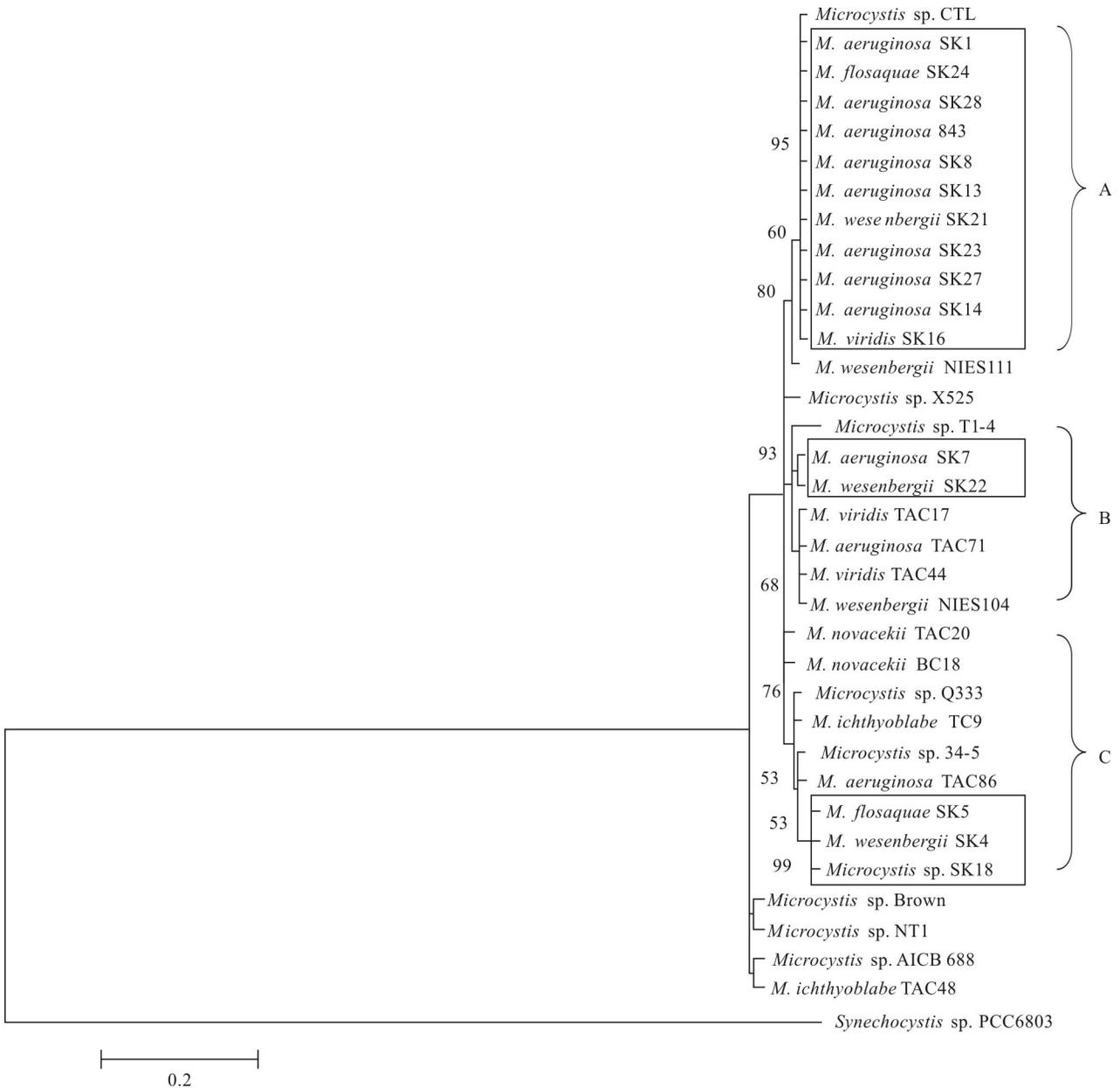


图1 微囊藻藻株 ITS 序列用邻接法构建的系统树。SK 序列的藻株为本实验室培养的藻株，节点旁数值表示 1000 次重复的 Bootstrap 值，低于 50 的 Bootstrap 值未标出来。

Fig. 1 Neighbour-Joining tree based on ITS sequences from different *Microcystis* strains. SK-marked strains were cultured in our laboratory. Data at nodes indicate bootstrap value of 1000 replicates and bootstrap less than 50 is omitted.

3 讨论

3.1 广东省水库微囊藻藻株的产毒特征分析比较

自然条件下产毒和非产毒的微囊藻在形态上并没有差别，在显微镜下不能辨别，基于微囊藻毒素合成酶基因的 PCR 检测可将产毒和非产毒的微囊藻加以区分。本文通过扩增产毒基因 *mcyE* 来区分产毒和非产毒藻株，结果有 89.3% 的藻株检测到

产毒基因。有研究曾对广东省 11 水库水体中微囊藻的产毒基因 *mcyB* 进行扩增，结果表明水体中能检测到微囊藻的产毒基因^[19]。对广州市 8 个主要的风景湖泊水样中微囊藻的产毒基因进行扩增，结果在 90% 以上的样品中能够扩增出目的片段^[20]。这些结果说明了产毒微囊藻在广东省水体中占优势。有研究报道，从日本的一个富营养化水库中分离的微囊藻藻株的平均 MCs 浓度为 $650 \mu\text{g g}^{-1}$ ，水

样中的毒素浓度为 $700 \sim 8800 \mu\text{g g}^{-1}$ ^[21]; 而葡萄牙某个水库中微囊藻的毒素含量为 $3200 \sim 11300 \mu\text{g g}^{-1}$, 水样中的毒素浓度为 $1600 \sim 7100 \mu\text{g g}^{-1}$ ^[22]。这与本研究结果一致, 说明分离藻株的毒素浓度比水样的毒素浓度低, 同时日本和欧洲水体的毒素浓度普遍比广东省水体中的毒素浓度偏高。

3.2 铜绿微囊藻、绿色微囊藻和水华微囊藻的产毒特征分析

本研究的 HPLC 的检测结果与产毒基因 *mcyE* 的 PCR 扩增结果都表明, 从广东省水库中分离的 14 株铜绿微囊藻都是产毒种类, 阳性检出率为 100%。有资料显示, 从欧洲一系列水体中分离的 224 株铜绿微囊藻中产毒种类占 73%^[23]。德国的 Wannsee 湖中有产毒基因 *mcyE* 的铜绿微囊藻种类占 70%, 产毒种比率比其它形态种的都高^[24]。葡萄牙一个水体中分离的 26 株铜绿微囊藻中有 62% 的藻株能够产生毒素^[25]。大量的研究表明, 水体中铜绿微囊藻主要是产毒种类, 但不同研究的结果也存在不一致性, 如从非洲一些水体中分离的 24 株铜绿微囊藻只有 4 株能够产毒, 产毒率为 17%^[26]。从日本水体中分离的 20 株铜绿微囊藻中只有 10% 能够检测到毒素^[27]。可见在不同水体中产毒铜绿微囊藻比率差异较大, 而广东省水库铜绿微囊藻的产毒种类比欧洲、日本、巴西、非洲一些水体的铜绿微囊藻产毒种类都偏高。

在本研究中, 绿色微囊藻、水华微囊藻的产毒种类分别占 100%、80%。Via-Ordorika 等的研究表明绿色微囊藻、水华微囊藻的产毒种类分别占 17%、50%^[23]。有研究表明, Wannsee 湖中产毒的水华微囊藻占 37%^[24], Watanabe 等报道产毒的绿色微囊藻种类较少^[28]。可见, 不同研究者的结论存在较大分歧, 产生这些结果不一致的原因可能有: (1) 有些研究太过依赖于实验室培养的藻株; (2) 对不同形态种分类方法的不一致性和同一形态种在不同环境条件下发生不同反应; (3) 研究者经验的不同而造成分类的不一致性等原因。虽然有些研究者认为形态种与毒素产生具有相关性, 根据不同的形态种有助于快速评估水体的危害程度, 但这些观点还需大量的深入的科研工作的支持。

3.4 微囊藻表型、产毒基因与ITS序列的相关性分析

有研究表明, 微囊藻的 16S rDNA 序列相似

度较高, 达到 90% 以上^[29-30]。Oliveira 认为 16S rDNA 相对比较保守, 不适合用于分析种间的遗传关系^[31]。而 16S-23S ITS 序列被认为基因突变频率较高, 含有的遗传信息较丰富, 用于分析种间的遗传关系效果更优。本研究结果表明, 广东省水库和来自不同地理区域的微囊藻的 ITS 序列相似度较高, 在系统进化树上没有分开, 导致有些分支检测的置信值较低。有研究报道, 微囊藻 16S-23S ITS 序列相似度大于 93%^[7]。宋立荣等用全细胞 PCR 扩增微囊藻的 *cpcBA*-IGS 序列来构建系统树, 结果表明来自中国南方与北方的藻株形成不同分支, 但与来自北半球的藻株没有分开, 来自北半球与南半球藻株聚集为一个类群^[32]。这些结果的复杂性有可能是不同的地理区域同一形态种有多种基因型, 同个基因型也可以有多种表现型, 从而造成分类上的误差。有研究报道, 微囊藻的表型与基因型没有相关性, 不同形态种的有些藻株有可能是同一物种^[7,30-31], Palinska 也提到在自然环境或在实验室培养条件下的藻株展现出来的表型多样性并不代表遗传多样性, 同一物种可能有多个生态型和表现型^[33]。因此, 微囊藻分类不能够太过于依赖形态特征, 把传统的分类方法与分子方法结合起来重新对现有的蓝藻进行分类是极其重要的。

Otsuka 等基于 16S-23S rRNA 序列与产毒基因 *mcyE*, 研究了 47 株微囊藻的毒性和系统进化关系, 结果表明微囊藻形态与产毒并没有相关性^[7], 日本 Mikata 湖中 61 株微囊藻聚类为 5 个类群, 其中 4 个类群同时包括产毒和非产毒的微囊藻藻株^[34]。Wu 等的研究也表明, *cpcBA*-IGS 序列与产毒基因的存在没有相关性^[32], 这些结果阐明了产毒和非产毒微囊藻在系统进化树上没有明确分开, 与研究结果一致。产毒和非产毒微囊藻在系统树上没有分开的原因可能是产毒的蓝藻在很久以前都是起源于一个共同的蓝藻祖先, 在长期的自然选择过程中一些蓝藻的某些基因发生了丢失, 从而导致藻株丧失了产毒的能力。因此, 产毒和非产毒藻株与 ITS 序列在系统树上的分布没有联系, 区分产毒和非产毒微囊藻最基本的方法就是检测是否有编码微囊藻毒素合成酶的单个或多个基因的存在。

参考文献

- [1] Yu S Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 1995, 10(6): 674-682.

- [2] Stanić D, Oehrle S, Gantar M, et al. Microcystin production and ecological physiology of Caribbean black band disease cyanobacteria [J]. *Environ Microbiol*, 2011, 13(4): 900–910.
- [3] Te S H, Gin K Y H. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore [J]. *Harm Algae*, 2011, 10(3): 319–329.
- [4] Komárek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 2. Chroococcales [J]. *Algol Stud*, 1986, 43(2): 157–226.
- [5] Otsuka S, Suda S, Li R, et al. Phylogenetic relationships between toxic and non toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 172(1): 15–21.
- [6] Whitton B A, Potts M. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space [M]. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000: 1–11.
- [7] Barry T, Collieran G, Glennon M, et al. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify *Eubacteria* [J]. *Genome Res*, 1991, 1(1): 51–56.
- [8] Navarro E, Simonet P, Normand P, et al. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer [J]. *Arch Microbiol*, 1992, 157(2): 107–115.
- [9] Lu W Q, Evans E H, McColl S M, et al. Identification of Cyanobacteria by polymorphisms of PCR amplified ribosomal DNA spacer region [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 153(1): 141–149.
- [10] Janse I, Edwin W, Kardinaa A, et al. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 3979–3987.
- [11] Chen D, Zhang Q, Qian K C, et al. Sequence analysis of 16S rRNA gene from 3 of *Microcystis flos-aquae* in Guangdong reservoirs [J]. *J Ecol Sci*, 2006, 25(1): 41–42.
陈迪, 章群, 钱开城, 等. 广东省水库3株水华微囊藻16S rRNA 序列分析 [J]. *生态科学*, 2006, 25(1): 41–42.
- [12] Liu H L, Zhang Q, Li M L, et al. Sequence analysis of *gyrB* gene from *Microcystis* in Lake Taihu and Tangxi Reservoir in Guangdong Province [J]. *J Lake Sci*, 2010, 22(2): 221–226.
刘海林, 章群, 李名立, 等. 太湖和广东汤溪水库微囊藻 $gyrB$ 基因序列分析 [J]. *湖泊科学*, 2010, 22(2): 221–226.
- [13] Qian K C, Chen D, Lin S J, et al. The analysis of PC-IGS sequences from four freshwater *Microcystis* sp. [J]. *J Ecol Sci*, 2005, 24(2): 150–153.
钱开城, 陈迪, 林少君, 等. 两株淡水微囊藻的藻蓝蛋白基因间隔序列(PC-IGS)分析 [J]. *生态科学*, 2005, 24(2): 150–153.
- [14] Wang J, Xie S L, Wang Z J, et al. Molecular diversity and microcystin production of *Microcystis* in Fenhe River of Taiyuan [J]. *J Lake Sci*, 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.
- [15] Chen Y Q, He J Y, Zhuang L, et al. Sequence analysis of rDNA 16S-23S internal transcribed spacer of two freshwater *Microcystis* strains [J]. *Acta Hydrob Sin*, 1999, 23(1): 41–46.
陈月琴, 何家苑, 庄丽, 等. 二种淡水微囊藻rDNA 16S-23S基因间隔区的序列测定与分析 [J]. *水生生物学报*, 1999, 23(1): 41–46.
- [16] Han B P, Li T, Lin X D. The Study about Eutrophication and Prevention Measures in Guangdong Large and Medium Reservoirs [M]. Beijing: Science Press, 2003: 3–6.
韩博平, 李铁, 林旭钿. 广东省大中型水库富营养化现状与防治对策研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 3–6.
- [17] Magana-Arachchi D N, Wanigatunge R P, Jeyanandarajah P. Setting up a polymerase chain reaction assay for the detection of toxic Cyanobacteria [J]. *J Natn Sci Found Sri Lanka*, 2008, 36(3): 229–233.
- [18] Sano T, Kaya K. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 386(1/2): 107–112.
- [19] Long S S. Foundation and application of PCR-based detection of microcystin synthetase gene [D]. Guangzhou: Jinan University, 2004: 1–55.
龙思思. 微囊藻毒素合成酶基因PCR检测方法的建立及应用 [D]. 广州: 暨南大学, 2004: 1–55.
- [20] Li M C. Seasonal distribution of toxic *Microcystis* of beauty spots in Guangzhou [D]. Guangzhou: Jinan University, 2007: 1–60.
李慕婵. 广州景观水体产毒微囊藻的季节分布特点 [D]. 广州: 暨南大学, 2007: 1–60.
- [21] Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, et al. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust Lake-reservoir (Morocco) [J]. *Toxicon*, 2001, 39(9): 1375–1381.
- [22] Vasconcelos V M, Sivonen K, Evans W R, et al. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters [J]. *Wat Res*, 1996, 30(10): 2377–2384.
- [23] Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, et al. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies [J]. *Sysm Appl Microbiol*, 2004, 27(5): 592–602.
- [24] Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, et al. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee [J]. *Microbial Ecol*, 2002, 43(1): 107–118.
- [25] Saker M L, Fastner J, Dittmann E, et al. Variation between

- strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river [J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 99(4): 749–757.
- [26] Haande S, Ballot A, Rohrlack T, et al. Diversity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from East-African water bodies [J]. *Arch Microbiol*, 2007, 188(1): 15–25.
- [27] Ohtake A, Shirai M, Adia T, et al. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(12): 3202–3207.
- [28] Watanabe M F, Harada K, Carmichael W W, et al. Isolation, cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan [M]// Watanabe M F, Harada K, Carmichael W W, et al. *Toxic Microcystis*. Boca Raton: CRC Press, 1996: 13–34.
- [29] Neilan B A, Jacobs D, Del-Dot T, et al. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1997, 47(3): 693–697.
- [30] Otsuka S, Suda S, Li R, et al. Phycoerythrin-containing *Microcystis* isolated from P. R. China and Thailand [J]. *Phycol Res*, 1998, 46(2): 45–50.
- [31] Bittencourt-Oliveira M C, de Oliveira M C, Bolch C J S. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria / Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*) [J]. *J Phycol*, 2001, 37(5): 810–818.
- [32] Wu Z X, Gan N Q, Song L R. Genetic diversity: Geographical distribution and toxin profiles of *Microcystis* strains (Cyanobacteria) in China [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49(3): 262–269.
- [33] Palinska K A, Liesack W, Rhiel E, et al. Phenotype variability of identical genotypes: The need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates [J]. *Arch Microbiol*, 1996, 166(4): 224–233.
- [34] Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, et al. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata [J]. *Environ Toxicol*, 2005, 20(3): 229–234.