

## 噬藻体生物多样性的研究动态

张奇亚

(中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 噬藻体(Cyanophage)是感染原核生物蓝藻(Cyanobacteria)的病毒,广泛分布于各种水生生态系统中,对调控初级生产力、蓝藻种群密度及结构演替、微生物间基因转移以及全球生物地球化学循环等方面有重大影响。关注噬藻体的生物多样性,发现其感染相关基因,阐明噬藻体与宿主蓝藻的相互作用,将为藻华控制及认识病毒在复杂水环境中的功能提供重要信息。本文就噬藻体生物多样性,包括生态系统多样性、物种多样性及遗传多样性研究动态做一综述。

**关键词:** 噬藻体, 生物多样性, 水生病毒, 基因组与功能基因, 蓝藻

### Advances in studies on biodiversity of cyanophages

ZHANG Qi-Ya

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract:** Cyanophages are viruses that infect prokaryotic blue-green algae (cyanobacteria) and widespread in different types of aquatic ecosystems. They can have a significant impact on regulation of primary productivity rate, density and succession of cyanobacteria, genetic transfer between microorganism, and global biogeochemical cycles, respectively. Thereby paying special attention to biodiversity of cyanophages, discovering cyanophage genes involved in the infection, clarifying the interaction between cyanophage and host, can also provide important information for developing novel approaches to control of cyanobacterial blooms and understanding the role of viruses play in complex water environments. This review focuses on recent advances in researches of the cyanophage biodiversity, including the ecosystem diversity, species diversity and genetic diversity of cyanophage.

**Keywords:** Cyanophage, Biodiversity, Aquatic virus, Genome and functional gene, Blue-green algae (Cyanobacteria)

在生物圈中,病毒被认为是最具丰富形式的生物类群<sup>[1]</sup>。据测算海洋病毒浓度平均为  $3 \times 10^9$  个/L, 而在水体环境中病毒的总量超过  $10^{30}$  个<sup>[2-3]</sup>。它们是存在于水生生态系统中个体最小、丰度最高的组成部分,也是许多生态系统过程的基本驱动力。已知在水生病毒(Aquatic virus—viruses in

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270213); 中国科学院方向项目(No. KSCXZ-EW-Z-3); 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金项目(No. 2011FBZ12)

\*通讯作者: ✉ zhangqy@ihb.ac.cn

收稿日期: 2013-11-26; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-08

aquatic ecosystems)中,有许多是感染原核蓝藻(Cyanobacteria,或称蓝菌)的噬藻体(Cyanophage,或称噬蓝菌体)<sup>[4-14]</sup>。从最初鉴定噬藻体“LPP”<sup>[15-16]</sup>,到发现巨病毒(Giant virus)、噬病毒体(Virophe)和转座病毒体(Transpovirons)等<sup>[17-21]</sup>;从水华蓝藻噬藻体的超微形态观察、分离培养与核酸制备<sup>[22-28]</sup>,到借助低温电子断层扫描、泛基因组(Pan-genome)和宏基因组(Metagenomics)测序、功能基因鉴定与系统进化生物信息分析等,用于噬藻体侵染过程动态行为可视监察、揭示噬藻体分子结构与侵染机制<sup>[29-45]</sup>;从“浮游病毒(Virioplankton)”概念的提出<sup>[46]</sup>,到了解水生病毒的种群多样性与丰度<sup>[47-50]</sup>及在环境气候和全球地理化学循环中的作用<sup>[10,51-54]</sup>;从起初测定淡水噬藻体基因组序列<sup>[55]</sup>,到解析系列巨型或超大型淡水病毒全基因组结构,如米米病毒(Mimiviruses,基因组 118 万个碱基对)、潘多拉病毒(Pandoraviruses,基因组 250 万个碱基对,含 2 500 个潜在基因)<sup>[56-57]</sup>,这些都意味着噬藻体等水生病毒的研究不断有新突破。研究表明,包括噬藻体在内的水生病毒不仅具有丰富的生物多样性,是亟待开发的全球最大生物多样性基因库,且这些病毒还具有控制藻华(赤潮)、调节水生态系统结构、以纳米尺度驱动全球生物地理化学循环的重大作用,是不可忽视的战略生物资源<sup>[51,58-62]</sup>。同时,这些研究极大地拓展了人类对水生病毒生物多样性的认识,也展现出尚待探索的水生病毒学未知领域。

我国关于水环境病毒的研究,始于 20 世纪 80 年代。武汉大学张楚瑜实验室对长江和武汉东湖水体中的病毒进行测试分析,并对检测到人类肠道病毒的结果做了报道<sup>[63-64]</sup>。至 90 年代初中期,国内学者多关注水环境中的人类病原病毒。笔者曾就“环境病毒与人类健康”发表述评,呼吁加强对水环境病毒研究<sup>[65]</sup>。中国预防医学科学院方肇寅等对不同地表饮用水源中的病毒进行了监测<sup>[66]</sup>。而 90 年代后期,才有关于藻病毒

中国科学院微生物研究所田波实验室针对藻类与人类的密切关系及生态学意义,从分离鉴定小球藻病毒入手,进行了真核藻病毒的分离和基因组核酸制备研究<sup>[67]</sup>。自 21 世纪初开始,中国科学院微生物研究所、水生生物研究所、武汉病毒研究所、地球化学研究所、海洋研究所、东北地理与农业生态研究所等中科院多个研究所,武汉大学、浙江大学、厦门大学、中国海洋大学、华中师范大学、上海海洋大学、昆明理工大学等多个院校,以及江苏省水产技术推广站、国家海洋环境监测中心及辽宁海洋水科院等单位的学者,围绕在淡水、海水和热泉等多种水环境中的噬藻体及不同水生微生物病毒,开展了检测技术、时空分布、丰度高低、噬菌体纯培养、理化及生物学特性、基因组结构及功能基因等多方面研究。

三十余年来,国内外关于噬藻体的研究纵横交织,相互促进。许多学者在教科书、论著以及专业期刊和杂志中,从不同层面报道了噬藻体等水生病毒研究的结果与进展<sup>[12,61,68-78]</sup>。在此,本文主要就噬藻体生物多样性的研究动态作一概述。

## 1 噬藻体生态系统多样性

噬藻体是以蓝藻为宿主的病毒。蓝藻作为光合自养生物,是地球上出现最早的原核生物,在只要有水和有光的地方就有它们的踪迹,因而在江河湖海的水中、蓄有静止或流动的淡水或咸水湿地、热泉和冰窟等水环境中也都可能存在噬藻体。我国幅员辽阔,自然条件复杂,水生态系统多样,物种生态组成和群落结构会因时空分布与温度高低不同而存在差异。

### 1.1 淡水噬藻体与水生微生物病毒

位于武汉市的东湖是我国最大的城中湖,也是在长江中下游具代表性的浅水型富营养化湖泊。刘艳鸣等运用透射电镜及荧光显微技术,对东湖水样中的浮游病毒丰度及多样性进行了研究。结果显示,东湖中浮游病毒的丰度达到  $10^8$  个/mL<sup>[79]</sup>。还深入分析了湖区不同采样站周年浮游病毒丰度及种群结构的动态变化,结果为:

浮游病毒丰度在春季最高, 冬季最低。从病毒类群的大小来看, 东湖水中的优势类群是 30–60 nm 组的浮游病毒, 约占总量的 62%; 而从形态来看, 有尾浮游病毒含量接近 50%。浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量(标志浮游植物的生物量)相关性显著, 而与浮游细菌丰度相关性不显著, 这表明东湖浮游病毒的宿主主要是蓝藻和浮游植物<sup>[80–81]</sup>。因此可认为, 东湖水中的病毒主要是噬藻体。

陆婷等应用 SYBR Green I 荧光显微镜计数, 检测了位于贵州兼具蓄水、供水和防洪功能的阿哈湖及百花湖中浮游病毒的丰度。这是两个均为季节性缺氧、但又具有不同化学背景和营养程度的高原淡水湖。结果显示, 病毒丰度与细菌丰度的比值(VBR)变化范围为 4–13; 病毒丰度为  $(1.87–12.50) \times 10^7$  个/mL, 各取样点的病毒丰度大小顺序为: 百花湖>阿哈湖入湖区>阿哈湖湖心区; 病毒丰度由湖水表层至底层呈减少趋势。在阿哈湖湖心区, 病毒丰度与溶解性有机碳(Dissolved organic carbon, DOC)呈显著正相关<sup>[82]</sup>。

孙小磊等运用荧光显微计数, 对湖北省 15 个营养水平不同的淡水湿地水样中的浮游病毒进行测试, 结果浮游病毒丰度与活菌数和叶绿素 *a* 浓度显著相关, 也与溶氧量(Chemical oxygen demand, COD)和水温显著相关。认为在富营养化水体中, 噬菌体(而不是噬藻体)是水体中浮游病毒的优势种类<sup>[83]</sup>。

国内对淡水噬藻体的分离和鉴定工作与此同时也在进行中。赵以军等分离到一株裂解绍线藻和席藻的噬藻体, 这是一株含 36 kb DNA 基因组的短尾噬藻体; 27 °C 时裂解织线藻的周期为 4 h, 释放量约 200 个空斑形成单位(Plaque forming unit, PFU)/细胞。60 °C 处理 10 min 可使 99% 噬藻体失活<sup>[84]</sup>。汤显春等电镜分别观察到 2 株滇池微囊藻噬藻体, 一株是头部、尾部直径分别约为 61 nm 和 288 nm×10 nm 的长尾噬藻体, 另一株是头部、尾部直径分别约为 56 nm 和 156 nm×12 nm 的短尾噬菌体<sup>[85]</sup>。高恶斌等从东湖水样中分离到

一株感染和裂解水华蓝藻的噬藻体(*Planktothrix agardhii* Virus from Lake Donghu, PaV-LD), 并采用终点稀释方法对 PaV-LD 进行纯化。电镜观察显示, PaV-LD 是平均直径约 80 nm 的无尾二十面体病毒; 其感染宿主细胞的潜伏期为 2–3 d, 子代噬藻体释放量为 350 个感染活性单位(Infectious units, IU)/细胞。PaV-LD 对氯仿不敏感; pH 在 4.5–10.0 范围时, PaV-LD 感染活性稳定; 低温下能较长时间保存, 但当保存温度高于 50 °C 时, 就使之完全灭活<sup>[25]</sup>。刘露等在太湖蓝藻水华暴发区的水样中, 筛选到一株感染铜绿微囊藻、直径约 50 nm 的短尾噬藻体。测定结果显示, 当感染复数(Multiplicity of infection, MOI)为  $10^{-5}$  时, 该噬藻体感染铜绿微囊藻的潜伏期为 2 h, 裂解期为 4–6 h, 稳定期为 6–12 h, 裂解量为 4 PFU/细胞。在不加保护剂时, 此噬藻体在 -20 °C 和 -80 °C 条件下保存会失活, 但在 4 °C 条件下保存其感染活性可维持 50 d 以上<sup>[86]</sup>。

## 1.2 海水噬藻体与水生微生物病毒

Wang 等利用流式术对青岛近海海域微型浮游生物(含病毒)的丰度及分布进行了测试分析。结果显示病毒丰度范围从  $7 \times 10^6$  个/mL 到  $5 \times 10^7$  个/mL, 在取样海域中, 病毒丰度的垂直分布无显著差异<sup>[87]</sup>。赵苑等在 2007 年 6–8 月, 利用荧光显微镜技术对胶州湾 14 个站点的浮游病毒丰度进行了检测, 分析病毒在不同月份的水平与垂直分布变化, 结果显示, 胶州湾浮游病毒的丰度平均值约为  $(6 \pm 5) \times 10^7$  个/mL, 在 7 月, 病毒丰度明显高于另外两个月, 并呈现从湾内、湾口至湾外递减的趋势; 其中藻类病毒占总浮游病毒的比例较高; 在病毒丰度超过  $10^8$  个/mL 的 9 个样品中, 8 个来自胶州湾内采样站, 仅 1 个来自湾口<sup>[88]</sup>。段翠兰等对江苏沿海海域浮游病毒丰度进行四季调查。结果显示, 苏北浅滩海域病毒含量最高, 约为  $5 \times 10^7$  个/mL; 吕泗海域最低, 为  $3 \times 10^4$  个/mL; 冬季最高, 夏季次之, 春秋季节较低; 同时, 除秋季外, 水体表层浮游病毒丰度高于底层; 春季浮游病毒与叶绿素 *a* 和细

菌均存在显著相关性<sup>[89]</sup>。于佐安等利用荧光显微技术,对大连市长海县大长山岛和广鹿岛两个虾夷扇贝养殖海区内,浮游病毒的水平与垂直分布及季节变化进行测试分析。结果显示,浮游病毒丰度在近岸水域高于远岸水域,海水表层高于10 m 水层及底层,春夏两季高于秋冬,与叶绿素 *a* 和水温呈正相关,而与盐度和溶氧浓度无显著相关性<sup>[90]</sup>。

### 1.3 极端水环境中的微生物病毒

张亚锋等采用电子显微镜、双层平板及 DNA 限制性酶切分析方法,从腾冲热海 61–94 °C 酸性热泉富集液中分离纯化病毒,并对它们的形态特征进行观察分析。存在头尾型、丝状、球状、纺锤形等多种不同形态的病毒颗粒;结果还显示不同酸性热泉样品富集培养物中病毒 DNA 的限制性酶切图谱存在明显差异。结果表明,腾冲热海高温酸性热泉中病毒具有形态种类多样性。同时分离到一株呈纺锤形、大小为 220 nm×80 nm,简称为 STSV2 (*Sulfolobus tengchongensis* spindle-shaped virus)的硫化叶菌病毒<sup>[91]</sup>。

## 2 噬藻体及水生微生物病毒的物种多样性

由于病毒的微观属性及纯培养技术的限制,人类对病毒物种多样性的了解很有限,但从超微结构和极端水环境中微生物病毒类群来看,噬藻体物种的多样性还是能由此窥见一斑。

### 2.1 噬藻体形态种类的多样性

迄今通过负染电镜观察到的噬藻体和噬菌体总数超过 6 000 株,为已知最大的病毒群。其中有 96%或更多噬藻体与噬菌体为含双链 DNA 的有尾病毒,其它则为含单链或双链的 DNA 或 RNA 基因组的多面体、丝状体或呈多形性的病毒<sup>[92-93]</sup>。常见的噬藻体分类可归属为有肌尾科 (*Myoviridae*)、长尾科 (*Siphoviridae*) 和短尾科 (*Podoviridae*);此外还有多科无尾目噬藻体,如:微小噬菌体科 (*Microviridae*)、被脂病毒科 (*Corticoviridae*)、复层噬菌体科 (*Tectiviridae*)、光滑噬菌体科 (*Leviviridae*)、囊状噬菌科

(*Cystoviridae*)、丝状噬菌体科 (*Inoviridae*) 和芽生噬菌体科 (*Plasmaviridae*)。国际病毒分类的权威机构(The International Committee on Taxonomy of Viruses, 国际病毒分类委员会)在近期发布的第九次报告中,将已认定的病毒归类分为 6 个目、87 个科和 349 个属,其中一个目就是有尾噬菌体目 (*Caudovirales*)<sup>[94-95]</sup>。可见有尾噬藻体归属有尾目,此外归为其它病毒目或分类待定。

噬藻体的主要形态特征见图 1。对噬藻体家族的形态、分类地位、基因组类型及大小比较见表 1。

笔者实验室借助电镜对来自武汉东湖超富营养区水样进行观察,初步可见有 76 种形态各异、具近似球形头部、有尾或无尾的病毒颗粒,其中长尾病毒科 26 种、肌尾病毒科 27 种、短尾病毒科 12 种、复层噬菌体科 2 种、囊状噬菌体科 2 种、微小纺锤噬菌体科 2 种、覆盖噬菌体科 1 种和 4 种其它形态的病毒颗粒。另外还观察到了一些线状、杆状、弹状和多边形的浮游病毒颗粒。这表明东湖水环境中的浮游病毒不仅丰度极高,而且形态丰富多样<sup>[79]</sup>。

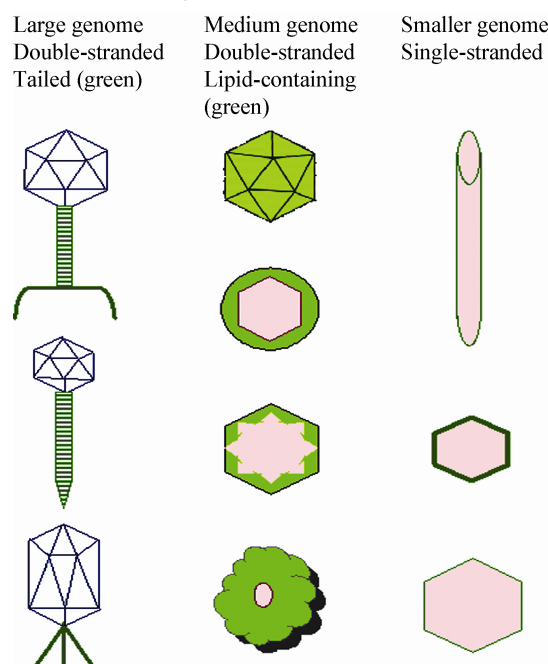
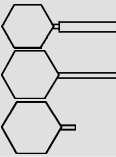



图 1 噬藻体形态示意图

Figure 1 Schematic representation of cyanophag morphologies

表 1 噬藻体家族信息纵览 <sup>[92-94]</sup> Table 1 Overview of cyanophage families <sup>[92-94]</sup>				
Shape	Order or family	Nucleic acid particulars size	Member	Number
	<i>Caudovirales</i> 有尾目	dsDNA (L), no envelope		
	<i>Myoviridae</i> 肌尾科	Tail contractile	T4	1 312
	<i>Siphoviridae</i> 长尾科	Tail long, noncontractile	1	3 262
	<i>Podoviridae</i> 短尾科	Tail short	T7	771
	Unassigned 待定目			
	<i>Microviridae</i> 微小噬菌体科	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	φX174	38
	<i>Corticoviridae</i> 被脂病毒科	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	PM2	3?
	<i>Tectiviridae</i> 复层噬菌体科	dsDNA (L), nner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	PRD1	19
	<i>Leviviridae</i> 光滑噬菌体科	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
	<i>Cystoviridae</i> 囊状噬菌科	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	φ6	3
	<i>Inoviridae</i> 丝状噬菌体科	ssDNA (C), filaments or rods, (85–1 950)×7 nm	fd	66
	<i>Plasmaviridae</i> 芽生噬菌体科	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MVL2	5

Note: C: Circular; L: Linear.

2.2 水生微生物病毒的种类多样性

在极端水环境中，存在一些特殊的藻和微生物，如南极的冰藻<sup>[96]</sup>、温泉的红藻<sup>[97]</sup>等，而宿主类型不同就会导致噬藻体种属和形态有差异。有趣的是从海洋或热泉等特殊水环境中，发现了许多奇特的病毒类群。见图 2，从形态来看，可分为瓶形(Bottle-shaped)、纺锤形(Spindle-shaped)、水滴形(Droplet-shaped)、双尾形(Double tailed-shaped)、纤维状(Filamentous-shaped)和棒状(Rod-shaped)等。其中有呈瓶形的有瓶形噬菌体科 *Ampullaviridae*；呈小纺锤形的有纺锤形噬菌体科 *Fuselloviridae* 和盐末端蛋白噬菌体属 *Salterprovirus* 病毒；呈水滴样的微滴形噬菌体科 *Guttaviridae* 病毒等；双尾形，有二突病毒科 *Bicaudaviridae* 的病毒；呈纤维状、有囊膜、可分为 α 脂毛噬菌体属 *Alphalipothrixvirus*、β 脂毛噬菌体属 *Betalipothrixvirus*、γ 脂毛噬菌体属 *Gammalipothrixvirus* 和 λ 脂毛噬菌体属 *Deltalipothrixvirus* 等 4 个属的有脂毛噬菌体科 *Lipothrixviridae* 病毒；还有呈棒状的有小杆状噬

菌体科 *Rudiviridae* 病毒，一端带有纹饰。

国外学者对在极端水环境中，形态特殊的病毒种类已进行了大量观察和研究。La Scola 等在英格兰布拉德福德市(Bradford)一座冷却水塔的水样中，观察到体积大小接近细菌、被称为拟菌病毒(Mimivirus)的巨病毒<sup>[17]</sup>。而 Sime-Ngando 等

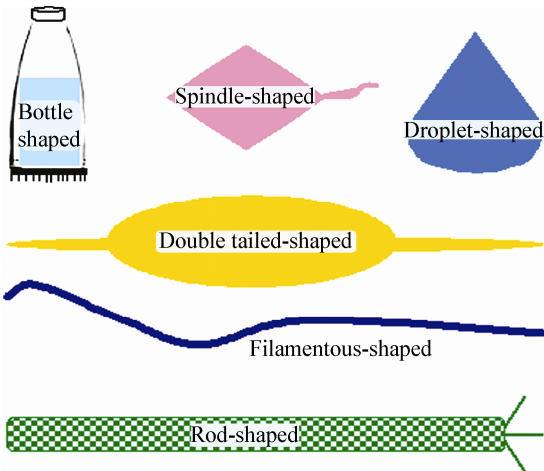


图 2 不同热泉古菌病毒形态的示意图  
Figure 2 Schematic representation of various Crenarchaeota virion morphologies



在非洲塞内加尔玫瑰湖(一个超盐湖)的水样中,观察到发夹形、杆状、小念珠状、钩状、蝌蚪状、芦苇状等不同形态的病毒<sup>[98]</sup>。随后,Fischer等揭示在巨病毒内,还存在貌似卫星病毒、但抑制或损害所寄生病毒的噬病毒体(Viophage)<sup>[50]</sup>。Yau等在对南极一个高盐湖的水样进行分析时,从感染藻的大DNA病毒(Phycodnavirus)中检出呈二十面体的有机湖噬病毒体(Organic lake virophage, OLV),这是继变形虫病毒 APMV (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*)的噬病毒体(Sputnik virophage)和鞭毛虫病毒 CroV (*Cafeteria roenbergensis virus*)的噬病毒体(Mavirus virophage)之后,所报道的第三个噬病毒体<sup>[99]</sup>。Fischer等指出这些噬病毒体能将宿主病毒和其它微生物的基因转移到自己的基因组中,产生显著的基因混合效果<sup>[100]</sup>。当噬病毒体中部分独立核酸片段在融合宿主基因组后,能再次穿梭,并可能成为巨型病毒之间基因交换的载体。这些移动的DNA片段类似在活细胞基因组中穿梭的转座子,因而被称为转座病毒体(Transpovirons)。Desnues等经分析认为,这些转座病毒体还能随机插入拟菌病毒的基因组中,在病毒间进行基因转移,进而影响巨病毒基因组的组成与结构<sup>[20]</sup>。

Philippe等近期在不同大陆发现了两株更大的病毒——“潘多拉病毒(Pandoravirus)”。其中一株是来自澳大利亚墨尔本附近淡水池塘水样中的噬藻体 *Pandoravirus dulcis*,另一株是来自智利Tunquen河口水样中的病毒 *Pandoravirus salinus*。它们的基因组DNA含190–250万个碱基对,大小甚至达到已知拟菌病毒科成员Megavirus的两倍。在普通显微镜下观察,这些巨型病毒更像是一些活着的细胞,而不是人们所熟悉的病毒。*Pandoravirus dulcis*的宿主是一类呈全球分布的海洋微型浮游植物球石藻(*Coccolithophore Emiliana huxleyi*),该藻是海洋生态系统的重要组成部分,也是大洋产生大规模白色水华的原因。有关结果提示,这类病毒有广泛的地域分布<sup>[57]</sup>。

拟菌病毒(Mimivirus)、噬病毒体(Viophage)和潘多拉病毒(Pandoravirus)形态模式见图3。

### 3 噬藻体的遗传多样性

遗传多样性主要表现为生物种群内基因组或基因的变化,因此通过测试基因组的大小、序列和结构,可获得噬藻体遗传多样性的更多知识。Kelly等揭示噬藻体普遍存在基因增减和变异,如新增来自宿主藻的基因、出现病毒复制相关基因及病毒结构基因变化等,噬藻体基因组的这些结构变化导致噬藻体遗传多样性<sup>[101]</sup>。Bryan等和Dreher等经研究证明,噬藻体携带大量来自宿主的基因,使之成为含有丰富基因种类的基因库<sup>[102-103]</sup>。Clasen等认为病毒与宿主藻之间进行

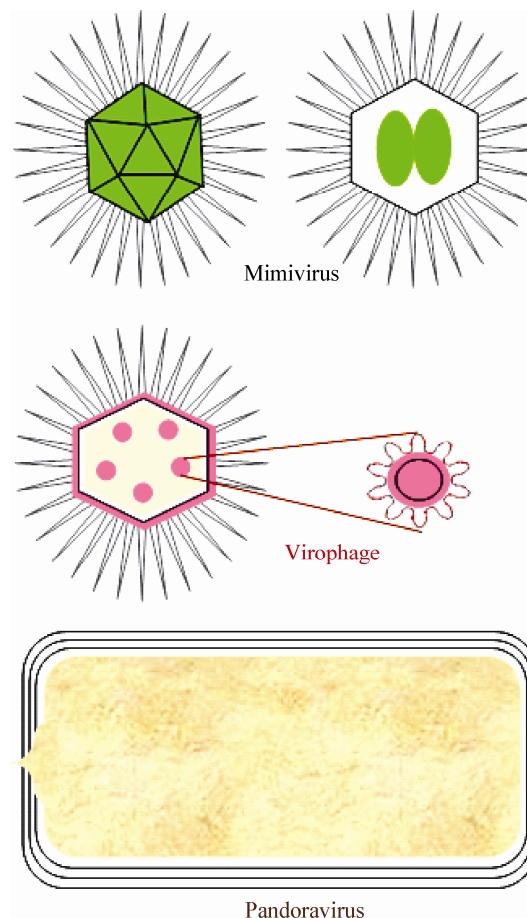


图3 拟菌病毒、噬病毒体和潘多拉病毒模式图  
Figure 3 Schematic representation of Mimivirus, Virophage and Pandoravirus morphologies

基因水平转移也是造成噬藻体遗传多样性的原因<sup>[104]</sup>。Culley 等经数据分析,认为海洋病毒有超过 60%的基因序列在 GenBank 中找不到<sup>[105]</sup>。

3.1 已知噬藻体基因组及其遗传学特征

迄今,仅测定了 8 株淡水噬藻体全基因组序列,它们是肌尾噬藻体 MaMV-DC、Ma-LMM01 和 S-CRM01 ;短尾噬藻体 Pf-WMP3、Pf-WMP4、A-4L 和 PP,以及无尾噬藻体 PaV-LD<sup>[26,28,55,103,106-109]</sup>。其中 PaV-LD、MaMV-DC 和 A-4L 三株淡水噬藻体全基因组为笔者实验室所测定,它们分别为所属科待定的丝状蓝藻噬藻体 PaV-LD (*Planktothrix agardhii* Virus isolated from Lake Donghu)<sup>[109]</sup>、铜绿微囊藻肌尾噬藻体 MaMV-DC (*Microcystis aeruginosa* myovirus isolated from Lake Dianchi)<sup>[26]</sup>和鱼腥藻短尾噬藻体 A-4L (*Anabaena variabilis* siphovirius)<sup>[28]</sup>。现将它们的宿主、基因组大小、推导的开放阅读框数量等作一比较,见表 2。

Kimura 等对噬藻体尾鞘基因的分析表明,微囊藻噬藻体基因存在高度遗传多样性<sup>[110]</sup>。由于淡水和海水中的微生物群落对渗透压的耐受性存在差异,推测存在淡水特定的噬藻体分支。因此 Roux 等运用宏基因组学方法,对两个淡水湖中的病毒特异性群落进行了分析和评估,结果不仅凸显非常广泛的病毒种群遗传多样性,也证实

在水体或其它水生生态系统中,噬藻体基因组结构的确有所不同<sup>[111]</sup>。Sullivan 等对 16 株海洋肌尾噬藻体与其它 10 株肌尾非噬藻体的基因组进行分析比较,从中找到 38 个与病毒结构或病毒复制相关的核心基因及 25 个噬藻体特有基因<sup>[112]</sup>。

刘艳鸣等采用脉冲场凝胶电泳,对东湖水样中的浮游病毒基因组大小进行了测定。显示在属于噬藻体和噬菌体的基因组大小范围内,有 5 条主要核酸带,其大小分别为 20、50、100、150 和 250 kb,其中以 20–60 kb 的核酸带为强。这也表明不仅东湖浮游病毒具有基因组多样性,也佐证其中优势类群为噬藻体<sup>[113]</sup>。

通过宏基因组数据集和相关的蛋白质组信息对海洋病毒进行分析,海洋噬藻体的资料还是比淡水噬藻体的要多些。据 Hurwitz 等统计截至 2012 年 11 月,基因库中共注册了 115 株海洋噬藻(菌)体的基因组序列<sup>[39]</sup>。

3.2 噬藻体 PaV-LD 基因组的转录时序

之前,尚未见有关噬藻体基因转录时序的相关报道。在高恶斌等对丝状蓝藻噬藻体 PaV-LD 全基因组结构进行解析,利用质谱鉴定 PaV-LD 基因组缺少已知噬藻体必备的尾结构蛋白,鉴定 PaV-LD 为无尾噬藻体的基础上<sup>[109]</sup>,进一步利用实时荧光定量 PCR 技术,随机选取 PaV-LD 的 14 个

表 2 八株淡水噬藻体及其基因组 Table 2 Eight freshwater cyanophages with completely sequenced genomes							
Name	Family	Host	Genome structure	Genome size (bp)	No. of ORFs	G+C%	GenBank accession No.
PaV-LD	Unassigned	<i>Planktothrix</i>	Linear	95 299	142	41.5	HQ683709
MaMV-DC	<i>Myoviridae</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Linear	169 223	170	46.0	KF356199
Ma-LMM01	<i>Myoviridae</i>	<i>Microcystis</i>	Circularly permuted linear	162 109	184	45.0	AB231700
S-CRM01	<i>Myoviridae</i>	<i>Synechococcus</i>	Circularly permuted linear	178 563	294	39.7	HQ615693
Pf-WMP4	<i>Podoviridae</i>	<i>Phormidium</i>	Linear	40 938	41	51.8	DQ875742
Pf-WMP3	<i>Podoviridae</i>	<i>Phormidium</i>	Linear	43 249	41	46.5	EF537008
A-4L	<i>Podoviridae</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	Linear	41 750	38	43.4	KF356198
PP	<i>Podoviridae</i>	<i>Plectonema</i> and <i>Phormidium</i>	Linear	42 480	41	46.4	KF598865

潜在功能基因进行转录分析。如图4(结果尚未发表)所示, PaV-LD 的功能基因依病毒生命周期顺序基本有规律地进行转录, 这些基因转录谱依次分为: DNA 复制相关基因(Replication gene :005R, 007R, 010R)、生物合成相关基因(Biosynthesis gene :018R, 020R, 022L, 036R, 037R, 053L)、病毒组装相关基因(Assembly gene :064R, 073R), 以及裂解释放或子代病毒侵入相关基因(Release or Enter gene :033R, 088R, 123L)等四类。在此, 首次提供噬藻体基因组转录和表达具有严格时序性的直接证据。这样噬藻体可保证合成的蛋白在其生命活动过程中准确定位与发挥功能, 并高效复制子代噬藻体。

### 3.3 噬藻体 PaV-LD 三个已鉴定的功能基因

Gao 等在进行 PaV-LD 序列比对时认识到基因组中的 022L 是一个蓝藻 *NbIA* 同源基因, 而该基因通常是使藻胆体蛋白降解的关键基因。通过基因克隆、免疫印迹、光谱测定和电镜观察等综合分析, 证实 PaV-LD 的 022L 确实是能编码具有藻胆体降解功能的蛋白 *NbIA*, 该蛋白表达后能使蓝藻培养物由蓝绿色变成浅黄色, 细胞中

藻胆体蛋白含量显著下降, 导致藻的类囊体结构遭受破坏, 甚至完全消失, 从而鉴定出噬藻体 PaV-LD 基因组内具有使藻胆体降解的 *NbIA*<sup>[109]</sup>。内肽酶(Endopeptidase)是一种水解细菌(包括蓝藻)细胞壁肽聚糖中间部分肽链的酶, Moak 等鉴定了携带这种酶基因的噬藻体<sup>[114]</sup>。Gründling 等研究证实穿孔素(Holin)是另一种溶细胞的酶, 能使细胞膜形成小孔, 从而引起细胞的裂解<sup>[115]</sup>。在解析 PaV-LD 基因组之后, 显示在该噬藻体基因组序列中, 内肽酶基因(123L)与穿孔素基因(124L)连接在一起, 形成 123L-124L<sup>[109]</sup>。李三华等先经 PCR 扩增 PaV-LD 编码的内肽酶和穿孔素基因 123L-124L, 构建质粒 pOP123L-124L, 再将其转入模式藻集胞藻 PCC6803 细胞中, 形成重组藻; 然后测定并比较重组藻与野生藻的超微结构及生长速率。结果重组藻出现缺损细胞壁, 且其生长速率也显著低于野生藻。这表明携带噬藻体 PaV-LD 的穿孔素基因和内肽酶基因的重组质粒不仅能在模式藻 PCC6803 中表达, 而且表现有水解蓝藻细胞壁肽及裂解宿主藻细胞的功能<sup>[116]</sup>。

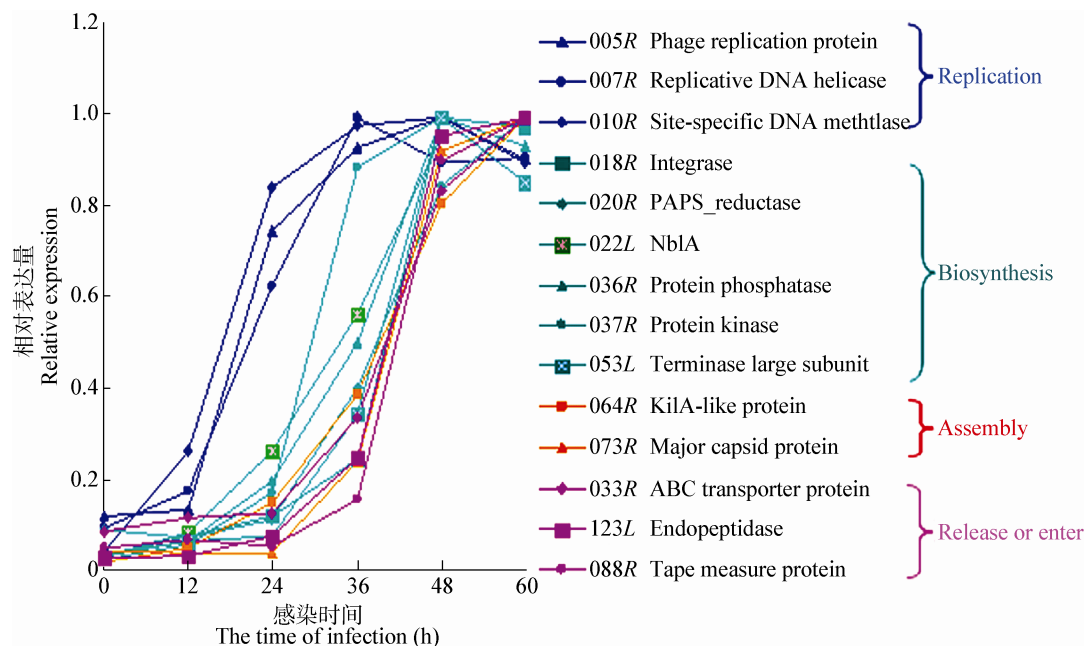


图4 噬藻体 PaV-LD 的 14 个预测功能基因的转录时序  
Figure 4 Transcriptional analysis of PaV-LD 14 predicted genes



### 3.4 噬藻体几种代谢相关基因

肽脱甲酰基酶(Peptide deformylase, PDF)是一种细菌必需的酶,在蛋白质合成中起到从甲硫氨酸残基脱 N 端甲酰基的作用。Frank 等鉴定出噬藻体 S-SSM7 的 PDF,经测序及晶体结构分析,找到其作用位点,证实噬藻体编码辅助代谢基因有利于更多的子代病毒复制<sup>[117]</sup>。

Gross 等阐明焦磷酸核苷酸水解酶(Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, MazG)可对营养、压力和应激起调节作用,也是细胞程序性死亡的调控因子<sup>[118]</sup>。Bryan 等从英吉利海峡的水样中,分离到一株可编码焦磷酸水解酶 MazG 基因的聚球藻肌尾噬藻体 S-PM2。另外,在其它水域噬藻体中也检测到 MazG 基因同源物。分别对不同噬藻体与宿主的 MazG 基因系统作进化分析,显示噬藻体与其宿主的 MazG 基因不聚在同一簇,因而推测噬藻体 MazG 基因并非来自宿主,而是由噬藻体频繁进行横向基因转移所致<sup>[102]</sup>。

DNA 聚合酶(DNA-directed DNA polymerase, DDDP)是各种细胞生物都必备的酶,而编码 DNA 聚合酶的基因可用来预测不同生物体的进化关系。Labonte 等和 Chan 等先后从肌尾和短尾病毒科的噬藻体中,鉴定了编码 DNA 聚合酶基因和线粒体 DNA 聚合酶基因<sup>[119-120]</sup>。Chen 等根据该基因设计出简并引物,对美国切萨皮克(Chesapeake)海湾连续两年进行了夏、冬两季表层、中层及底层水中的短尾科噬藻体遗传多样性的研究。结果显示,该海湾短尾科噬藻体相当丰富,且夏季噬藻体的组成与冬季不同,呈现季节性变化<sup>[121]</sup>。

Sebastian 等经研究鉴定碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)基因,该基因编码对底物去磷酸化的酶,在藻类和浮游植物中普遍存在,对其吸收利用有机磷时起重要作用<sup>[122]</sup>。Sullivan 等经测序分析,在海洋噬藻体基因组中也找到编码碱性磷酸酶的基因<sup>[112]</sup>。因此,Goldsmith 等认为可将海洋病毒的碱性磷酸酶基因(*phoH*)作为评估海洋噬藻体生物多样性的一个新的标记基因<sup>[123]</sup>。

### 3.5 噬藻体光合基因

海洋蓝藻的光合作用膜像植物叶绿体那样,也含有两个光合体系,光合体系-I (PSI)调控电子从质体蓝素向铁氧化还原蛋白转移,光合体系-II (PSII)调控电子从水到质体醌的转移。Chen 等认为噬藻体携带编码 PSII 光合体系的中心蛋白 PsbA 和能与之形成复合物的蛋白 PsbD 基因,而且可能是一个普遍现象<sup>[121]</sup>,Chenard 等证实噬藻体光合基因还具有进化多样性<sup>[124-125]</sup>。Sharon 等指出有感染性的噬藻体之所以携带光合系统基因 *psbA* 与 *psbD*,不仅能将它们整合到宿主基因组中,以满足宿主增强光合作用的需要,而且可增强噬藻体的适应性<sup>[126]</sup>。当优化光合作用时,噬藻体的 DNA 复制与病毒扩增也处于良好状态,从而可提高子代病毒产量。

Breitbart 等提供证据表明,噬藻体兼有光合作用、磷酸戊糖途径、核苷酸的生物合成三种细胞代谢途径<sup>[127]</sup>,并认为噬藻体侵入细胞后,可经协同进化而获得宿主代谢基因,掌控宿主,从而提高自身复制效率。

光合作用和呼吸作用是碳循环的基础,然而光合作用完成生物固碳,而呼吸作用的戊糖磷酸途径是氧化脱羧和燃烧释放二氧化碳,这是两个目的相反的反应。令人费解的是噬藻体携带的宿主不同的代谢相关基因,究竟是起固碳作用还是起燃烧作用呢?Thompson 等结合生理学、酶学和测序的方法就此开展研究,结果找到关于噬藻体调动碳储存燃烧,而不是固碳的相关证据<sup>[35]</sup>。

### 3.6 噬藻体的结构蛋白基因

通常,噬藻体编码的主要衣壳蛋白基因在特定病毒种群中具有高度保守性。因此鉴定这类基因,可将其作为噬藻体感染性及分子进化的靶标基因,分析噬藻体的病原性,比较其进化地位,了解噬藻体种群结构、遗传、变异及与宿主互作等信息。

肌尾 T4 噬菌体是具有头和尾结构复合形态的病毒。Leiman 等分析 T4 噬菌体的结构蛋白后

指出,成熟病毒颗粒所含蛋白超过 40 种<sup>[128]</sup>。Nishima 等对 T4 尾部结构基因 *gp5* 及其功能进行了研究,指出该蛋白先通过螺旋运动刺入宿主菌外膜,然后发挥溶菌酶作用,进一步将孔扩大,并将遗传物质注入宿主细胞内。结果显示,噬菌体的结构蛋白 *gp5* 在病毒侵入宿主时可同时具有螺旋运动和溶菌酶等多重功能<sup>[129]</sup>。可见,对 T4 噬菌体功能蛋白研究的结果,能为研究 T4 样噬藻体(T4-like cyanophage)提供借鉴。

Thompson 等对肌尾噬藻体的结构蛋白基因 *g20* 和 *g23* 基因进行研究后,指出这两个基因在肌尾病毒科噬藻体中是高度保守的<sup>[35,130]</sup>。Butina 等从贝加尔湖水样中获得 41 个 *g23* 克隆,并对其进行了分类<sup>[131]</sup>。但 López-Bueno 等在南极一个淡水湖中检出多种 *g23* 基因,结果同源性较低,其编码氨基酸的序列与大多数已知同类基因的序列相似性低于 80%<sup>[9]</sup>。

Wang 等通过变性梯度凝胶电泳,对不同水稻田中的噬藻体 *g20* 进行分析,结果显示它们与来自淡水噬藻体和海水噬藻体的 *g20* 有所不同。据此推测不同水环境中的噬藻体可能分别存在各自的发育与遗传多样性系统<sup>[132]</sup>。认为如将 *g20* 作为噬藻体遗传多样性标记基因,有一定局限性。其一,该基因只存在于肌尾科噬藻体中,不适用其它噬藻体;其次,*g20* 基因与 T4 噬菌体衣壳蛋白基因高度同源,在 PCR 扩增过程中有可能将 T4 噬菌体与噬藻体的相关片段都扩增出来,因而出现假阳性结果。

Zhou 等在对所测定 5 株噬病毒体基因组进行比对分析时了解到,它们含保守基因丛,并且共享主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)和次要衣壳蛋白(Minor capsid protein, mCP)这两个核心基因<sup>[133]</sup>。

#### 4 噬藻体的纯培养

数据库中病毒的资料很有限,即使有些噬藻体基因序列的资料,其中大多数也只是些未知功能和生理作用的序列信息。由于自然界有许多细

胞微生物都无法进行人工培养,被称为“不可培养微生物(Viable but nonculturable, VBNC)”<sup>[134]</sup>。需要在活的蓝藻细胞内才可复制的噬藻体,其纯培养也就更困难。因此,对噬藻体等微生物的纯培养是研究其形态、生理、遗传特性及资源利用的前提。

李明源等从明永冰川融水中分离获得一株裂解性低温噬菌体 MYSP03,该噬菌体是一株头部直径约 72 nm,尾大小为 240 nm×10 nm 的长尾型噬菌体,对氯仿不敏感,基因组为双链 DNA,大小约 66 kb。该噬菌体在 4 °C 时具侵染活性,在 4–20 °C 范围内可产生边缘清晰、透明的噬菌斑,最适感染温度约 10 °C,最适感染 pH 约 9.4<sup>[135]</sup>。Cai 等从厦门海域分离出一株能够裂解杀藻菌 SP48 的肌尾噬菌体  $\phi$ ZCW1,并证实该噬菌体可通过裂解杀藻菌来间接调控赤潮藻塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的生长<sup>[136]</sup>。

为了深入认识噬藻体的分子结构和本质特征,笔者实验室分别取武汉东湖、云南滇池等淡水湖泊的水样,对不同蓝藻,如丝状蓝藻、铜绿微囊藻、鱼腥藻等进行了感染实验。有些噬藻体获得纯培养,有些噬藻体仅能传数代,但更多的噬菌体无法培养。只有对纯培养的噬藻体才可进一步分析其生物学和理化特征。Gao 等在从武汉东湖水样中分离培养噬藻体 PaV-LD 的同时,对在光照、温度等不同培养条件下,及在不同来源的蓝藻细胞中,PaV-LD 的增殖效率与裂解作用进行了测定分析。将 PaV-LD 接种到生长期、半连续培养更新率或光照不同的宿主蓝藻液中,并采用稀释培养计数方法与电镜观察,测定子代 PaV-LD 释放量及宿主细胞的裂解作用。结果在光照条件下感染 3–4 d 后,宿主蓝藻细胞充分裂解,并释放大量子代 PaV-LD,病毒滴度由初始  $7 \times 10^3$  IU/mL 快速增加到  $8 \times 10^7$  IU/mL;电镜观察到感染的蓝藻细胞类囊体膜结构消失,而大量子代 PaV-LD 颗粒主要分布在宿主蓝藻的类囊体部位。但在遮光条件下,同样感染的蓝藻细胞不裂

解, 检测不到子代噬藻体。由此推测, 宿主蓝藻细胞的培养条件和状态可能对获得噬藻体纯培养有决定性影响<sup>[25]</sup>。Ou 等利用蓝藻株铜绿微囊藻 FACHB-524, 对肌尾噬藻体 MaMV-DC 进行了挑斑分离, 并获得纯培养物<sup>[26]</sup>。Li 等用 12 株不同蓝藻对东湖水样进行噬藻体分离时, 电镜检出鱼腥藻双生病毒样颗粒 (*Anabaena spiroides* geminivirus-like, AsGV-L) 和铜绿微囊藻覆盖病毒样颗粒 (*Microcystis aeruginosa* corticovirus-like, MaCV-L), 但遗憾的是这两种病毒样颗粒的培养仅限于 2–3 代<sup>[27]</sup>。廖湘勇等还对一株感染鱼腥藻的短尾噬藻体 A-4L 在藻苔中形成同心圆噬斑的成因进行了分析。结果显示, 在周期光照条件下, 藻苔接种 A-4L 3–4 d 后, 出现同心圆噬斑, 且同心圆数量与攻毒后的天数( $n$ )呈正相关, 其相关性为“ $n-1$ ”; 两个同心圆之间的间距约为 3 mm。与周期光照条件相比, A-4L 在持续光照条件下感染宿主蓝藻, 并未形成同心圆噬斑。而在周期光照条件转持续光照条件下, 由先周期光照时所形成的同心圆在转持续光照后逐渐消失, 证实同心圆噬斑的形成依赖于周期光照<sup>[28]</sup>。

## 5 结语

综上所述, 噬藻体丰富的生物多样性不仅体现在生态系统多样性(Ecosystem diversity)、物种多样性(Species diversity)与形态多样性(Morphological diversity), 还体现在基因组结构与遗传多样性(Genetic diversity)等方面<sup>[137-143]</sup>。尤其是近些年, 关于非有尾噬藻体及其特性的鉴定、噬藻体所携带宿主基因及其功能验证、大个头潘多拉病毒的发现, 还有噬病毒体内可移动遗传元件(转座病毒体 Transpoviron)的揭示等系列报道, 体现自然界和地球生物圈中有最大遗传与生物多样性的种群就是包括噬藻体在内的水体病毒。坚持对噬藻体种群与基因结构的探究, 将会解开更多微生物的奥秘, 极大地增进或从根本上修正我们对生物多样性及生物进化的认识与理解。

## 参考文献

- [1] Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(10): 801-812.
- [2] Magagnoli M, Corinaldesi C, Monticelli LS, et al. Viral abundance and distribution in mesopelagic and bathypelagic waters of the Mediterranean[J]. Deep Sea Research Part I, 2007, 54(8): 1209-1220.
- [3] Danovaro R, Frascchetti S, Belgrano A, et al. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems[J]. Nature, 2008, 454(7208): 1084-1087.
- [4] Bergh Ø, Børsheim KY, Bratbak G, et al. High abundance of viruses found in aquatic environments[J]. Nature, 1989, 340(6233): 467-468.
- [5] Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. Nature, 1999, 399(6736): 541-548.
- [6] 张奇亚. 浮游病毒[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 691-696.
- [7] Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(6): 504-510.
- [8] 张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源——淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用[J]. 中国科学院院刊, 2009, 24(4): 414-420.
- [9] López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, et al. High diversity of the viral community from an Antarctic lake[J]. Science, 2009, 326(5954): 858-861.
- [10] Rohwer F, Thurber RV. Viruses manipulate the marine environment[J]. Nature, 2009, 459(7244): 207-212.
- [11] Rodriguez-Brito B, Li L, Wegley L, et al. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments[J]. The ISME Journal, 2010, 4: 739-751.
- [12] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒与病毒病图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [13] Breitbart M. Marine viruses: truth or dare[J]. Annual Review of Marine Science, 2012, 4: 425-448.
- [14] Zhao Y, Temperton B, Thrash JC, et al. Abundant SAR11 viruses in the ocean[J]. Nature, 2013, 494(7437): 357-360.
- [15] Safferman RS, Morris ME. Algal virus: isolation[J]. Science, 1963, 140: 679-680.
- [16] Schneider IR, Diener TO, Safferman RS. Blue-green algal virus LPP-1: purification and partial characterization[J]. Science, 1964, 144: 1127-1130.
- [17] La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae[J]. Science, 2003, 299(5615): 2033.
- [18] La Scola B, Desnues C, Pagnier I, et al. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus[J]. Nature, 2008, 455(7205): 100-104.
- [19] Fischer MG, Allen MJ, Wilson WH, et al. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(45): 19508-19513.
- [20] Desnues C, La Scola B, Yutin N, et al. Provirophages and

- transposons as the diverse mobilome of giant viruses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(44): 18078-18083.
- [21] Pennisi E. Ever-bigger viruses shake tree of life[J]. Science, 2013, 341(6143): 226-227.
  - [22] Safferman RS, Morris M. Growth characteristics of the blue-green algal virus LPP-1[J]. Journal of Bacteriology, 1964, 88: 771-775.
  - [23] Luftig R, Haselkorn R. Morphology of a virus of blue-green algae and properties of its deoxyribonucleic acid[J]. Journal of Virology, 1967, 1: 344-361.
  - [24] Sherman LA, Haselkorn R. LPP-1 infection of the blue-green alga *Plectonema boryanum*. I. Electron microscopy[J]. Journal of Virology, 1970, 6: 820-833.
  - [25] Gao EB, Yuan XP, Li RH, et al. Isolation of a novel cyanophage infectious to filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (cyanophyceae) from Lake Donghu in China[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2009, 54: 163-170.
  - [26] Ou T, Li S, Liao X, et al. Cultivation and characterization of the MaMV-DC cyanophage that infects bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. Virologica Sinica, 2013, 28(5): 266-271.
  - [27] Li SH, Ou T, Zhang QY. Two virus-like particle cyanophages causing lytic infections in freshwater cyanobacteria[J]. Virologica Sinica, 2013, 28(5): 303-305.
  - [28] 廖湘勇, 欧铜, 高宏, 等. 蓝细菌病毒 A-4L 在鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 藻苔中形成同心圆噬斑的成因[J]. 微生物学报, 2014, 54(2): 191-199.
  - [29] Dai W, Fu C, Raytcheva D, et al. Visualizing virus assembly intermediates inside marine cyanobacteria[J]. Nature, 2013, DOI: 10.1038/nature12604.
  - [30] Holmfeldt K, Solonenko N, Shah M, et al. Twelve previously unknown phage genera are ubiquitous in global oceans[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(31): 12798-81203.
  - [31] Sullivan MB, Lindell D, Lee JA, et al. Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts[J]. PLoS Biology, 2006, 8: e234.
  - [32] Desnues C, Rodriguez-Brito B, Rayhawk S, et al. Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites[J]. Nature, 2008, 452: 340-343.
  - [33] Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Brito B, et al. Explaining microbial population genomics through phage predation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7: 828-836.
  - [34] Schoenfeld T, Liles M, Wommack KE, et al. Functional viral metagenomics and the next generation of molecular tools[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18: 20-29.
  - [35] Thompson LR, Zeng Q, Kelly L, et al. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(39): E757-E764.
  - [36] Rosario K, Breitbart M. Exploring the viral world through metagenomics[J]. Current Opinion in Virology, 2011, 1: 289-297.
  - [37] Sharon I, Battchikova N, Aro EM, et al. Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities[J]. The ISME Journal, 2011, 5: 1178-1190.
  - [38] Huang SJ, Wang K, Jiao NZ, et al. Genome sequences of siphoviruses infecting marine *Synechococcus* unveil a diverse cyanophage group and extensive phage-host genetic exchanges[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14: 540-558.
  - [39] Hurwitz BL, Sullivan MB. The pacific ocean virome (POV): a marine viral metagenomic dataset and associated protein clusters for quantitative viral ecology[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57355.
  - [40] Solonenko SA, Ignacio-Espinoza JC, Alberti A, et al. Sequencing platform and library preparation choices impact viral metagenomes[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 320.
  - [41] Clasen JL, Hanson CA, Ibrahim Y, et al. Martiny JBH Diversity and temporal dynamics of Southern California coastal marine cyanophage isolates[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2013, 69: 17-31.
  - [42] Dwivedi B, Xue B, Lundin D, et al. A bioinformatic analysis of ribonucleotide reductase genes in phage[J]. BMC Evolutionary Biology, 2013, 13: 33.
  - [43] Labrie SJ, Frois-Moniz K, Osburne MS, et al. Genomes of marine cyanopodoviruses reveal multiple origins of diversity[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 1357-1376.
  - [44] Ignacio-Espinoza J, Solonenko SA, Sullivan MB. The global virome: not as big as we thought?[J]. Current Opinion in Virology, 2013, 3(5): 566-571.
  - [45] Brum JR, Schenck RO, Sullivan MB. Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses[J]. The ISME Journal, 2013, 7(9): 1738-1751.
  - [46] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 69-114.
  - [47] Kenzaka T, Tani K, Nasu M. High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level[J]. The ISME Journal, 2010, 4(5): 648-659.
  - [48] Arslan D, LeGendre M, Seltzer V, et al. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(42): 17486-17491.
  - [49] Alperovitch-Lavy A, Sharon I, Rohwer F, et al. Reconstructing a puzzle: existence of cyanophages containing both photosystem-I and photosystem-II gene suites inferred from oceanic metagenomic datasets[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 24-32.
  - [50] Fischer MG. Sputnik and Mavirus: more than just satellite viruses[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(1): 78.
  - [51] Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'Anno A, et al. Marine viruses and global climate change[J]. FEMS

- Microbiology Reviews, 2011, 35(6): 993-1034.
- [52] Payet JP, Suttle CA. To kill or not to kill: the balance between lytic and lysogenic viral infection is driven by trophic status[J]. Limnology and Oceanography, 2013, 58: 465-474.
- [53] Shelford EJ, Middelboe M, Moller EF, et al. Virus-driven nitrogen cycling enhances phytoplankton growth[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2012, 66(1): 41-46.
- [54] Zeng Q, Chisholm SW. Marine viruses exploit their host's two-component regulatory system in response to resource limitation[J]. Current Biology, 2012, 22(2): 124-128.
- [55] Yoshida T, Nagasaki K, Takashima Y, et al. Ma-LMM01 infecting toxic *Microcystis aeruginosa* illuminates diverse cyanophage genome strategies[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(5): 1762-1772.
- [56] Raoult D, Audic S, Robert C, et al. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus[J]. Science, 2004, 306: 1344-1350.
- [57] Philippe N, Legendre M, Doutre G, et al. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes[J]. Science, 2013, 341(6143): 281-286.
- [58] Raven JA. Aquatic viruses: the emerging story[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2006, 86, 449-451.
- [59] Ash C, Hurlley S, Lavine M, et al. Paradigms in the virosphere[J]. Science, 2006, 312(5775): 869.
- [60] Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF, et al. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles[J]. Science, 2008, 320: 1034-1039.
- [61] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [62] Deng L, Gregory A, Yilmaz S, et al. Contrasting life strategies of viruses that infect photo- and heterotrophic bacteria, as revealed by viral tagging[J]. mBio, 2012, 3(6): e00373.
- [63] 张楚瑜, 李丕芬, 李军, 等. 滑石粉-硅藻土技术浓缩水中病毒效果的研究[J]. 环境科学, 1983, 6(2): 54-56.
- [64] 李劲, 李丕芬, 王祖卿, 等. 长江武汉段水中病毒污染的研究[J]. 环境科学学报, 1987, 7(2): 231-236.
- [65] 张奇亚, 吴云. 环境病毒与人类健康[J]. 自然杂志, 1991, 12: 927-931.
- [66] 方肇寅, 宋燕燕, 董虹, 等. 北京饮用水源病毒污染研究[J]. 病毒学报, 1992, 8(3): 240-244.
- [67] 张远征, 樊卫国, 李冬玲, 等. 中国小球藻病毒及其分子生物学性质[J]. 微生物学报, 1998, 38(3): 176-180.
- [68] 赵以军, 石正丽, 黄国锦, 等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展[J]. 中国病毒学, 1999, 14(2): 100-105.
- [69] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 水环境的植物病毒及其生态效应[J]. 中国病毒学, 2000, 15(1): 1-7.
- [70] 张奇亚. 鱼类和水生动物病毒分子生态学[M]//向近敏, 林雨霖, 周峰. 分子生态学: 第二卷. 武汉: 湖北科技出版社出版, 2001: 184-190.
- [71] 韩继刚, 刘平芳, 康明, 等. 小球藻病毒 PBCV-1 特异性溶壁酶(Lysin)的溶壁活性[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 354-358.
- [72] 杨小茹, 郑天凌, 苏建强, 等. 海洋病毒——一种新的、潜力巨大的赤潮防治工具[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(5): 651-656.
- [73] 汪岷, 王芳. 浮游病毒遗传多样性的研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1224-1232.
- [74] 胡志红, 陈新文, 姜治平, 等. 合成生命之探索——人造噬藻体[J]. 中国科学院院刊, 2011, 26(2): 179-183.
- [75] 张永雨, 黄春晓, 杨军, 等. 海洋微生物与噬菌体间的相互关系[J]. 科学通报, 2011, 56(14): 1071-1079.
- [76] 李洪波. 极地浮游病毒的研究进展[J]. 极地研究, 2012, 24(4): 415-422.
- [77] 李升康, 李传标. 海洋病毒在海洋微生物群落及生物地球化学循环中的作用研究进展[J]. 海洋科学, 2013, 37(3): 117-121.
- [78] Ge XY, Wu YQ, Wang MN, et al. Viral metagenomics analysis of planktonic viruses in East Lake, Wuhan, China[J]. Virologica Sinica, 2013, 28: 280-290.
- [79] 刘艳鸣, 张奇亚, 袁秀平. 武汉东湖浮游病毒的丰度及多样性[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 1-6.
- [80] Liu YM, Yuan XP, Zhang QY. Spatial distribution and morphologic diversity of virioplankton in Lake Donghu, China[J]. Acta Oecologica-International Journal of Ecology, 2006, 29: 328-334.
- [81] Liu YM, Zhang QY, Yuan XP, et al. Seasonal variation of virioplankton in a eutrophic shallow lake[J]. Hydrobiologia, 2006, 560: 323-334.
- [82] 陆婷, 梁小兵, 曾佳, 等. 贵州高原湖泊细菌和病毒分布特征及影响因素[J]. 生态学杂志, 2009, 28(10): 1996-2001.
- [83] 孙小磊, 赵以军, 刘妮, 等. 淡水湿地浮游病毒的空间分布[J]. 生态学报, 2009, 29(2): 1048-1054.
- [84] 赵以军, 程凯, 石正丽, 等. 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定[J]. 自然科学进展, 2002, 12(9): 923-927.
- [85] 汤显春, 宋立荣, 沈银武, 等. 滇池微囊藻病毒溶藻的研究[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 50-51, 55.
- [86] 刘露, 郭宗楼, 黄朴, 等. 一株太湖水域蓝藻噬藻体的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 339-343.
- [87] Wang M, Liang Y, Bai X, et al. Distribution of microbial populations and their relationship with environmental parameters in the coastal waters of Qingdao, China[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(7): 1926-1939.
- [88] 赵苑, 武洪庆, 李洪波, 等. 胶州湾浮游病毒的分布研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(7): 86-92.
- [89] 段翠兰, 李洪波, 邹勇, 等. 张永江江苏沿岸海域浮游病毒的时空分布[J]. 水生生物学报, 2012, 36(5): 971-977.



- [90] 于佐安, 李文姬, 张明, 等. 大连市长海县虾夷扇贝养殖海区浮游病毒的丰度[J]. 水产学报, 2011, 35(6): 911-917.
- [91] 党亚锋, 陈波, 张琦, 等. 腾冲热海高温酸性热泉类病毒颗粒多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 256-261.
- [92] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. Archives of Virology, 2007, 152: 227-243.
- [93] Ackermann HW. Bacteriophage taxonomy[J]. Microbiology Australia, 2011, 32: 90-94.
- [94] King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al. Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. London, UK: Elsevier Academic Press, 2011.
- [95] Hyman P, Abedon ST. Smaller Fleas: Viruses of microorganisms[J]. Scientifica, 2012(2012), 1-23.
- [96] Thomas DN, Dieckmann GS. Antarctic sea ice—a habitat for extremophiles[J]. Science, 2002, 295: 641-644.
- [97] Schönknecht G, Chen WH, Ternes CM, et al. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote[J]. Science, 2013, 339(6124): 1207-1210.
- [98] Sime-Ngando T, Lucas S, Robin A, et al. Diversity of virus-host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(8): 1956-1972.
- [99] Yau S, Lauro FM, Demare MZ, et al. Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(15): 6163-6168.
- [100] Fischer MG, Suttle CA. A virophage at the origin of large DNA transposons[J]. Science, 2011, 332(6026): 231-234.
- [101] Kelly L, Ding H, Huang KH, et al. Genetic diversity in cultured and wild marine cyanomyoviruses reveals phosphorus stress as a strong selective agent[J]. The ISME Journal, 2013, 7(9): 1827-1841.
- [102] Bryan MJ, Burroughs NJ, Spence EM, et al. Evidence for the intense exchange of MazG in marine cyanophages[J]. PLoS One, 2008, 3(4): e2048.
- [103] Dreher TW, Brown N, Bozarth CS, et al. A freshwater cyanophage whose genome indicates close relationships to photosynthetic marine cyanomyoviruses[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(7): 1858-1874.
- [104] Clasen JL, Suttle CA. Identification of freshwater *Phycodnaviridae* and their potential phytoplankton hosts, using DNA pol sequence fragments and a genetic-distance analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 991-997.
- [105] Culley AI, Lang AS, Suttle CA. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities[J]. Science, 2006, 312(5781): 1795-1798.
- [106] Liu XY, Shi M, Kong SL, et al. Cyanophage Pf-WMP4, a T7-like phage infecting the freshwater cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: complete genome sequence and DNA translocation[J]. Virology, 2007, 366: 28-39.
- [107] Liu XY, Kong SL, Shi M, et al. Genomic analysis of freshwater cyanophage Pf-WMP3 infecting cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: the conserved elements for a phage[J]. Microbial Ecology, 2008, 56: 671-680.
- [108] Zhou YR, Lin J, Li N, et al. Characterization and genomic analysis of a plaque purified strain of cyanophage PP[J]. Virologica Sinica, 2013, 28(5): 272-279.
- [109] Gao EB, Gui JF, Zhang QY. A novel cyanophage with cyanobacterial non-bleaching protein a gene in the genome[J]. Journal of Virology, 2012, 86(1): 236-245.
- [110] Kimura S, Sako Y, Yoshida T. Rapid microcystis cyanophage gene diversification revealed by long- and short-term genetic analyses of the tail sheath gene in a natural pond[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2789-2795.
- [111] Roux S, Enault F, Robin A, et al. Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through etagenomics[J]. PLoS One, 2012, 7: e33641.
- [112] Sullivan MB, Huang KH, Ignacio-Espinoza JC, et al. Genomic analysis of oceanic cyanobacterial myoviruses compared with T4-like myoviruses from diverse hosts and environments[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12: 3035-3056.
- [113] 刘艳鸣, 张奇亚. 利用脉冲场凝胶电泳测定东湖浮游病毒基因组的大小[J]. 武汉大学学报, 2005, 51(S2): 238-240.
- [114] Moak M, Molineux IJ. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(4): 1169-1183.
- [115] Gründling A, Manson MD, Young R. Holins kill without warning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(16): 9348-9352.
- [116] 李三华, 高恶斌, 欧铜, 等. 噬藻体 PaV-LD 主要衣壳蛋白、穿孔素和内肽酶基因的克隆及表达分析[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 252-259.
- [117] Frank JA, Lorimer D, Youle M, et al. Structure and function of a cyanophage-encoded peptide deformylase[J]. The ISME Journal, 2013, 7: 1150-1160.
- [118] Gross M. MazG—a regulator of programmed cell death in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(2): 590-601.
- [119] Labonte J, Reid KE, Suttle CA. Phylogenetic analysis indicates evolutionary diversity and environmental segregation of marine podovirus DNA polymerase gene sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 3634-3640.
- [120] Chan YW, Nenninger A, Clokie SJH, et al. Discovery of cyanophage genomes which contain mitochondrial DNA polymerase[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2269-2274.
- [121] Chen F, Wang K, Huang S, et al. Diverse and dynamic populations of cyanobacterial podoviruses in the Chesapeake Bay unveiled through DNA polymerase gene sequences[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(11): 2884-2892.
- [122] Sebastian M, Ammerman JW. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA[J]. The ISME Journal, 2009, 3:

- 563-572.
- [123] Goldsmith DB, Crosti G, Dwivedi B, et al. Development of phoH as a novel signature gene for assessing marine phage diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7730-7739.
- [124] Chenard C, Suttle CA. Phylogenetic diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene psbA in marine and freshwaters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5317-5324.
- [125] Williamson SJ, Rusch DB, Yooseph S, et al. The sorcerer II global ocean sampling expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples[J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1456.
- [126] Sharon I, Alperovitch A, Rohwer F, et al. Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes[J]. Nature, 2009, 461(7261): 258-262.
- [127] Breitbart M, Thompson LR, Suttle CA, et al. Exploring the vast diversity of marine viruses[J]. Oceanography, 2007, 20: 135-139.
- [128] Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, et al. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60: 2356-2370.
- [129] Nishima W, Kanamaru S, Arisaka F, et al. Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(34): 13571-13576.
- [130] Jacquet S, Zhong X, Parvathi A, et al. A First description of a cyanophage infecting the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (*Spirulina*)[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25: 195-203.
- [131] Butina TV, Belykh OI, Maksimenko SY, et al. Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal[J]. FEMS Microbiology Letter, 2010, 309(2): 122-129.
- [132] Wang G, Asakawa S, Kimura M. Spatial and temporal changes of cyanophage communities in paddy field soils as revealed by the capsid assembly protein gene g20[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76: 352-359.
- [133] Zhou J, Zhang W, Yan S, et al. Diversity of virophages in metagenomic data sets[J]. Journal of Virology, 2013, 87(8): 4225-4236.
- [134] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34: 415-425.
- [135] 李明源, 季秀玲, 王宝强, 等. 明永冰川融水中一株裂解性低温噬菌体的分离及特征[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 236-242.
- [136] Cai W, Wang H, Tian Y, et al. Influence of a bacteriophage on the population dynamics of toxic dinoflagellates by lysis of algicidal bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7837-7840.
- [137] Desnues C, Rodriguez-Brito B, Rayhawk S, et al. Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites[J]. Nature, 2008, 452: U340-U345.
- [138] Thurber RV. Current insights into phage biodiversity and biogeography[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(5): 582-587.
- [139] Houle D, Govindaraju D, Omholt S. Phenomics: the next challenge[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11: 855-866.
- [140] Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW, et al. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(4): 610-635.
- [141] Philoosof A, Battchikova N, Aro EM, et al. Marine cyanophages: Tinkering with the electron transport chain[J]. The ISME Journal, 2011, 5: 1568-1570.
- [142] Yoshida-Takashima Y, Yoshida M, Ogata H, et al. Cyanophage infection in the bloom-forming cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in surface freshwater[J]. Microbes and Environments, 2012, 27(4): 350-355.
- [143] Marston MF, Pierciey FJ Jr, Shepard A, et al. Rapid diversification of coevolving marine *Synechococcus* and a virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109: 4544-4549.