

研究报告

巢湖铜绿微囊藻 Chao 1910 的基因组学和磷代谢通路分析

计欣晔, 余荣成, 杜康, 周丛照*, 李旭*

中国科学技术大学生命科学与医学部 生命科学学院, 安徽 合肥 230027

计欣晔, 余荣成, 杜康, 周丛照, 李旭. 巢湖铜绿微囊藻 Chao 1910 的基因组学和磷代谢通路分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1491-1510.

Ji Xinye, Yu Rongcheng, Du Kang, Zhou Congzhao, Li Xu. Genome sequence analysis of phosphorus metabolism pathways of *Microcystis aeruginosa* Chao 1910 isolated from Chaohu Lake[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1491-1510.

摘要:【背景】铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)广泛分布于温带湖泊, 因产生微囊藻毒素且易成为蓝藻水华优势藻株而备受关注。【目的】基于全基因组序列分析和基因转录水平验证, 阐明从巢湖新分离的铜绿微囊藻 Chao 1910 的主要代谢通路和磷营养高效利用机制。【方法】通过第三代测序技术拼接获得 Chao 1910 的全基因组序列, 完成主要代谢通路的基因注释, 并对与蓝藻水华优势藻株形成相关的磷代谢通路进行深入分析。【结果】比较基因组学表明, Chao 1910 藻株与日本铜绿微囊藻 NIES-843 的亲缘关系最近, 其糖酵解、磷酸戊糖途径和核苷酸合成等代谢通路的基因组组成非常保守, 同时具有完整的磷转运、磷吸收、多聚磷酸盐合成/分解等磷营养高效利用的通路。不同于其他铜绿微囊藻, Chao 1910 藻株不具有微囊藻毒素合成基因簇, 推测其主要依靠对磷营养的高效利用获取生存竞争优势。【结论】Chao 1910 藻株是巢湖首株完成全基因组测序的铜绿微囊藻, 这将有助于揭示其获得生存竞争优势的分子机制, 为遏制巢湖蓝藻水华暴发提供依据。

关键词: 巢湖; 铜绿微囊藻 Chao 1910; 全基因组分析; 磷代谢通路分析

资助项目: 国家自然科学基金(U19A2020); 国家重点研发计划(2018YFA0903100)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U19A2020) and the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903100).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Congzhao, zcz@ustc.edu.cn; LI Xu, sachem@ustc.edu.cn

Received: 2022-08-15; Accepted: 2022-09-12; Published online: 2022-11-17

Genome sequence analysis of phosphorus metabolism pathways of *Microcystis aeruginosa* Chao 1910 isolated from Chaohu Lake

JI Xinye, YU Rongcheng, DU Kang, ZHOU Congzhao*, LI Xu*

School of Life Sciences, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China

Abstract: [Background] *Microcystis aeruginosa* is ubiquitous in temperate lakes and has aroused wide concern since it is a dominant bloom-forming cyanobacterium capable of producing microcystins. [Objective] To elucidate the central metabolic pathways and the efficient phosphorus-utilizing mechanism in *M. aeruginosa* Chao 1910 (termed Chao 1910 for short) isolated from Chaohu Lake based on the whole-genome sequence analysis and transcription verification. [Methods] The whole genome sequence was obtained by the third-generation sequencing technique, and the genes encoding the central metabolic pathways, especially the phosphorus metabolic pathways, were annotated. [Results] Chao 1910 had the closest phylogenetic relationship with *M. aeruginosa* NIES-843 among the *Microcystis* strains with known full-length genome sequences. The genes involved in the metabolic pathways such as glycolysis, pentose phosphate pathway, and nucleotide synthesis were highly conserved in Chao 1910. The genome of Chao 1910 encoded the complete pathways of phosphate transport, phosphate absorption, polyphosphate synthesis/decomposition, and other efficient phosphorus utilization pathways. Unlike other strains of *M. aeruginosa*, Chao 1910 did not possess the gene cluster for microcystin synthesis, which indicated that it relied on efficient phosphorus utilization to gain the competitive advantage. [Conclusion] Chao 1910 is the first *M. aeruginosa* strain with completed sequencing of the whole genome isolated from Chaohu Lake. It helps us to reveal the molecular mechanism of competitive advantage for the bloom-forming cyanobacteria in Chaohu Lake.

Keywords: Chaohu Lake; *Microcystis aeruginosa* Chao 1910; whole-genome analysis; phosphorus metabolic pathway analysis

蓝藻作为地球上最早的光合放氧生物,被认为是24亿年前“大氧化事件”发生的主要原因^[1-2]。蓝藻不但改变了整个地球生命系统的演化方向,还为整个水生态系统提供了基础的食物来源,并且贡献了大气中超过40%的氧气,一直以来都是维持地球生态平衡的关键力量。然而,随着近几十年来人类活动日益频繁,对自然水体的过度利用和污染导致水体富营养化不断加剧,

蓝藻在水生态系统中的生-灭平衡被打破,蓝藻水华事件在全球频频发生,引发了一系列严重的环境问题。

微囊藻是一类常见的有害水华蓝藻,在各个国家的湖泊、水库和河流中均有发现^[3-7]。微囊藻具备多种竞争优势:在水体中有效垂直移动以搜寻营养物质并获取最佳光照条件的能力^[8-10];通过生物被膜连接形成较大细胞群落从而有效

躲避浮游动物捕食的能力^[11-13]; 分泌微囊藻毒素及其他次级代谢产物抑制竞争者生长的能力^[14]; 能够在沉积物上休眠越冬并在合适的温度和生长条件下重新恢复生长的能力^[11-13]。这些能力为微囊藻成为多个水域中的优势蓝藻提供了重要支持。

巢湖是我国五大淡水湖之一, 作为一个浅水湖泊, 受区域人口、经济快速发展的影响, 近几十年来湖体富营养化压力较大, 虽然周边区域环境治理力度不断提升, 但是 2012–2018 年湖区生态调查数据显示, 巢湖湖体的总磷、总氮浓度、水华蓝藻总量及微囊藻生物量占比仍显著升高^[15-16]。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 是巢湖水华优势蓝藻中的一种, 因能产生具有肝毒性的微囊藻毒素(microcystin)而“臭名昭著”^[3]。在水华暴发期内, 表层水体中生物量激增会造成局部磷营养盐匮乏状态。铜绿微囊藻由于具备可在低磷环境下被激活的高亲和力磷酸盐吸收系统、能水解有机磷的磷酸酶(酸性/碱性)系统和能够以多聚磷酸盐形式过量储存磷的磷储备系统^[17-22], 所以在巢湖水华暴发期, 相较其他藻株具备显著的生存竞争优势^[19, 23-25]。然而, 由于基因组数据匮乏且缺乏有效的遗传操作手段, 铜绿微囊藻高效利用磷营养的分子机制和调控机理一直未被阐明。截至目前, NCBI 基因组数据库中仅收录了 11 株微囊藻的全基因组数据信息, 其中 8 株为铜绿微囊藻, 但仅有 1 株来自中国。

本研究组从巢湖分离获得了一株新的铜绿微囊藻, 将其命名为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) Chao 1910。获得 Chao 1910 的全基因组数据后, 我们注释和分析了其系统发育、次级代谢产物合成以及中心碳代谢和磷代谢通路基因, 在转录水平上验证了磷胁迫条件对磷高效吸收相关基因表达的影响。Chao 1910 藻株为巢湖首株完成全基因组测序的铜绿微囊藻, 该工作

能够帮助我们进一步了解巢湖中铜绿微囊藻高效利用磷营养的分子机制和调控机理, 将为巢湖蓝藻水华治理提供有效依据。

1 材料与方法

1.1 材料

铜绿微囊藻 Chao 1910 于 2019 年 10 月分离自巢湖。在光学显微镜下, 从巢湖水样中挑选微囊藻形态的菌落, 转入筛选培养基 BG11+0.15 $\mu\text{g/L}$ VB₁₂ 中培养。取藻液在含 1.5% 琼脂和 20 $\mu\text{mol/L}$ TES[N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸]的 BG11 pH 8.45 固体培养基中反复传代划线, 最终得到一株纯系蓝藻。经测序分析, 此纯系蓝藻为一株新的铜绿微囊藻, 将其命名为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) Chao 1910。藻株培养条件为: BG11 培养基, 培养温度(30 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, 120 r/min, 光照强度 2 000 lx, 光照周期为 12 h 光照、12 h 黑暗。

实验试剂及引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Eastep[®] 总 RNA 提取试剂盒, 上海普洛麦格生物产品有限公司; SYBR qPCR 通用试剂盒, Biosharp 公司; 反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit, 宝日医生物技术(北京)有限公司。光照培养箱摇床, 苏州捷美电子有限公司; 酶标仪, Molecular Devices 公司; qPCR 仪, 应用生物系统公司; PCR 仪, Biometra 公司; 离心机, Eppendorf 公司; 超微量分光光度计, 南京五义科技有限公司。

本实验所用培养基为藻类专用培养基 BG11, 参考文献[26]配制。

1.2 方法

1.2.1 基因组完成图测序与组装

取 OD₆₈₀ 约为 0.8 的 Chao 1910 藻液 3 L, 20 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 条件下离心 5 min, 留存藻液沉淀, 使用 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液)清洗 3 次, 弃

去上清液体,将藻液沉淀放入液氮中冷却 20 min,干冰条件下运输到天津生物芯片技术有限责任公司测序。

通过 Pacbio 第三代测序平台对 Chao 1910 的基因组进行测序和拼接,使用 Pacbio 官方分析软件 SMRT Link (V6.0.0.47841) 自带的 HGAP4 分析流程进行基因组 *de novo* 组装,最终得到精确的基因组完成图序列。上述工作为天津生物芯片技术有限责任公司完成。

1.2.2 基因组注释

采用 NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (PGAP) 对全基因组进行基因模型预测,获得基因模型的位置信息和氨基酸序列等信息^[27]。代谢通路注释分析使用 KEGG automatic annotation server,基因组图谱使用 CGview 绘制^[28-30]。

1.2.3 系统发育树的构建

从 NCBI 的 GenBank 数据库下载 16S rRNA 基因序列及 PhoX 蛋白的氨基酸序列,使用 MEGA 11.0 软件自带的 MUSCL 进行序列比对,系统树各分支的置信度由重复抽样法(bootstrap) 1 000 次重复检测,近邻法构建系统发育树^[31]。

1.2.4 产生次级代谢产物的潜力分析

采用 antiSMASH 6.0 软件,结合注释信息预测 Chao 1910 中次生代谢产物基因簇^[32]。

1.2.5 前噬菌体区域预测

采用在线预测软件 PHASTER (<http://phaster.ca/>),结合注释信息搜索可能的前噬菌体区域^[33]。

1.2.6 磷代谢通路分析

将注释后的 Chao 1910 基因组数据参考 KEGG 预测的代谢通路,确定基因组中心碳代谢途径和磷代谢通路相关的蛋白,分析 Chao 1910 的代谢通路。

1.2.7 磷胁迫实验

1) 铜绿微囊藻 Chao 1910 培养

取 OD_{680} 约为 0.8 的藻液 100 mL, $2\ 000\times g$

常温离心 5 min,用无磷的 BG11 培养基(使用等摩尔质量的 KCl 替代 K_2HPO_4)清洗细胞 3 次,分别使用无磷和正常的培养基重悬,再转入相应的培养基。

2) 铜绿微囊藻 Chao 1910 生长量测定

Chao 1910 的生长量以叶绿素 a 的含量变化反映,采用甲醇萃取测定叶绿素 a 的含量^[34]。取 1 mL 藻液, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $15\ 000\times g$ 离心 5 min,在沉淀中加入 1 mL 甲醇, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光萃取 2 h。分别在 665 nm 和 720 nm 处测定上清的吸光度值。

3) 铜绿微囊藻 Chao 1910 碱性磷酸酶活性测定

碱性磷酸酶活性的测定采用分光光度法,使用对硝基苯磷酸二钠盐(p-nitrophenyl phosphate, disodium, hexahydrate, p-NPP)为底物,在碱性磷酸酶的催化下,产生有颜色的对硝基苯酚(p-nitrophenol, p-NP),通过反应表征碱性磷酸酶活性^[35]。取 500 μL 藻液,加入 1 mL 反应液 [0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.5), 2 mmol/L MgCl_2 , 3.6 mmol/L p-NPP], $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴 30 min, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000\times g$ 离心 5 min,取上清在 410 nm 处测吸光度值。

4) 铜绿微囊藻 Chao 1910 总 RNA 提取

取 15 mL 藻液, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $2\ 000\times g$ 条件下离心 5 min,用液氮冻存藻液沉淀。使用普洛麦格总 RNA 提取试剂盒抽提 RNA,超微量分光光度计检测总 RNA 的质量和浓度,反转录试剂盒反转录得到 cDNA。

5) 铜绿微囊藻 Chao 1910 磷吸收相关基因转录水平检测

使用管家基因 Sec 蛋白转座复合物(part of Sec protein translocase complex)对应基因 *secA* 作为内参^[36]。RT-qPCR 引物信息见表 1。RT-qPCR 反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ 10 min; $95\ ^\circ\text{C}$ 15 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环; $95\ ^\circ\text{C}$ 15 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 1 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 15 min 得到熔解曲线。RT-qPCR 反应体系: $2\times\text{SYBR Green}$

表 1 荧光定量 PCR 引物信息

Table 1 The primers of RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Length of product (bp)
<i>ppx</i> -F	TTCTAGCCGGTTCGATCGTG	175
<i>ppx</i> -R	TTCAAAACACTGCGCTGACG	175
<i>secA</i> -F	TGGATTGACCGGAAAAGGGG	192
<i>secA</i> -R	CCGAGTTCGCTGTTAGTGGT	192
<i>ppk</i> -F	GCAGGTTTTCCCCGTTTTTC	165
<i>ppk</i> -R	CGCGTCACCCGAAAAGGATA	165
<i>pstS</i> -F	CTTCCGATGTGGCCATGAGT	173
<i>pstS</i> -R	CCAACGGGTAAATCGTGCCTA	173
<i>phoX</i> -F	CTTGGTTAGGGCGTTTTTCGC	187
<i>phoX</i> -R	GCCCCGTAGAGCATTCCTTT	187

ppx-F 为该基因的荧光定量 PCR 正向引物, *ppx*-R 为基因的荧光定量 PCR 反向引物. 下同

ppx-F was the forward primer of RT-qPCR for this gene, *ppx*-R was the reverse primer of real-time RT-qPCR for this gene. The same below.

qPCR Mix 25 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA (1 ng/ μ L) 1 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 1 μ L, RNase free ddH₂O 21 μ L。数据分析方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

2 结果与分析

2.1 铜绿微囊藻 Chao 1910 基因组的基本信息

Chao 1910 由本研究组 2019 年 10 月从巢湖分离纯化所得。经测序拼接, 其环状基因组的长度为 5 669 822 bp, GC 含量为 42.2% (图 1)。经分析预测, 该基因组中包含开放阅读框 5 607 个, tRNA 基因 42 个, 以及 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA 基因各 2 个(表 2)。该藻株的全基因组序列已上传至 NCBI GenBank 数据库, 索引编号为 CP097576。

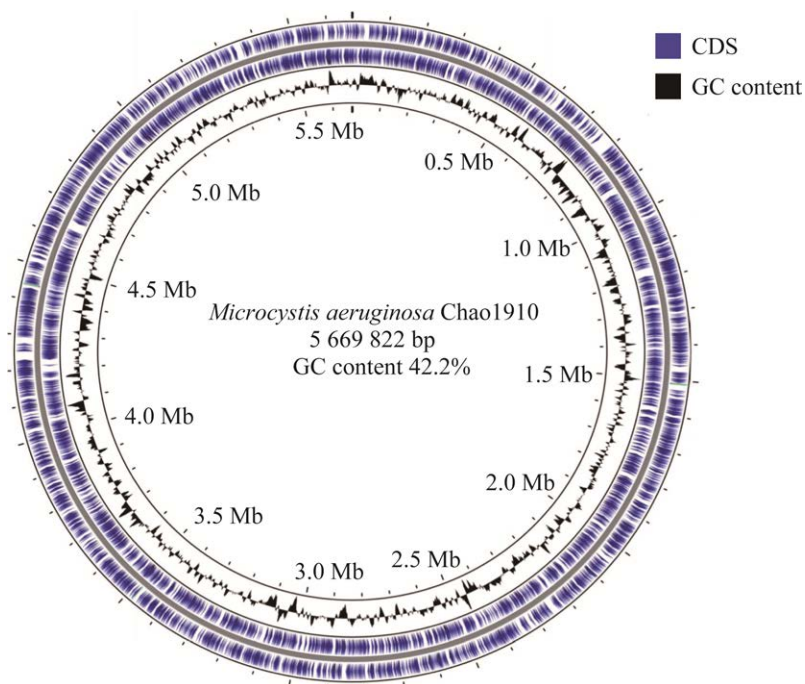


图 1 铜绿微囊藻 Chao 1910 基因组图谱 最外圈为基因组序列的位置坐标, 由外向里分别为基因信息和 GC 含量

Figure 1 The complete genome map of *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. The outermost circle is the location coordinate of the genome sequence, from the outside to the inside are the distribution of gene information and the GC content.

表 2 铜绿微囊藻 Chao 1910 的基因组数据

Table 2 Genome statistics of *Microcystis aeruginosa* Chao 1910

Attribute	Value
Chromosome size (bp)	5 669 822
Plasmid numbers	1
GC content (%)	42.2
Total number of CDs	5 659
Number of CDSs (with protein)	5 607
Number of 5S rRNAs	2
Number of 16S rRNAs	2
Number of 23S rRNAs	2
Number of tRNAs	42
Number of ncRNAs	4
CRISPR arrays	2

2.2 铜绿微囊藻 Chao 1910 系统发育分析

目前, NCBI 中收录有 11 株具有全基因组数据的微囊藻, 基于这 11 株微囊藻和 Chao 1910 的 16S rRNA 基因序列比对结果, 我们构建了

Chao 1910 的系统发育树(图 2)。结果显示, 12 株微囊藻聚类成了 2 个分离较远的簇, Chao 1910 与其他 7 株微囊藻位于同一发育树分支中, 其中与分离自日本霞浦淡水湖的铜绿微囊藻 NIES-843 的亲缘关系最近。

2.3 铜绿微囊藻 Chao 1910 次级代谢产物合成酶基因簇分析

经 antiSMASH 预测, 我们在 Chao 1910 基因组中共发现了 10 个次级代谢产物基因簇(表 3)。其中, 在蓝藻中普遍存在的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthase, NRPS)基因簇有 4 个; 剩余 6 个基因簇则可能分别参与萜烯类(terpene)、类核糖体合成和翻译后修饰的肽类(RiPP-like)和蓝藻素(cyanobactin)等化合物的合成(表 3)。

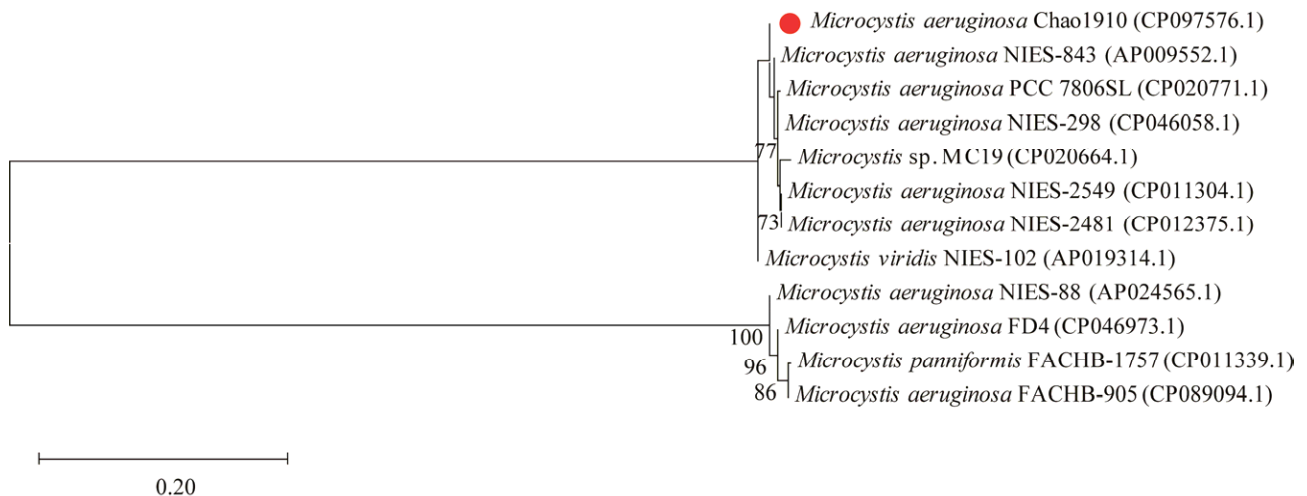


图 2 基于微囊藻 Chao 1910 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中数字为藻株基因组 GenBank 登录号; 分支点上的数字为自展值, 代表该分支结构的可信度; 底部的比例尺为进化距离标尺, 标尺上的数字代表标尺长度线段的序列差异度

Figure 2 Phylogenetic tree of based on *Microcystis* Chao 1910 16S rRNA gene sequence. The numbers in parentheses are the GenBank accession number of genome; The numbers at the branch points are bootstrap values and represent the credibility of the branch; The scale bar at the bottom is the evolutionary distance scale and the numbers on the scale represent the sequence divergence.

上述 10 个次级代谢产物基因簇中, 萜烯类 (区域 3 和 6)、Spliceotide (区域 5)、Proteusin & RiPP-like (区域 8 和 10) 这 5 个基因簇未能在已知次级代谢产物合成基因簇数据库中搜索到相似靶标。其他 5 个基因簇也仅能找到相似度较低的已知产物合成基因簇。其中, 区域 1 的基因簇与念珠藻 152 中 nostophycin 合成基因簇的相似性为 18%; 区域 2 的基因簇与棘孢小单孢菌中 calicheamicin 合成基因簇的相似性为 5%; 区域 4 的基因簇与微囊藻 PCC 7005 中 piricyclamide 合成基因簇的相似性为 33%; 区域 7 的基因簇与 *Salinispora arenicola* CNR107 中 BE-43547A1 合成基因簇的相似性为 13%; 区域 9 的基因簇与微囊藻 K-139 中 micropeptin K139 合成基因簇的相似性为 37%。此外, antiSMASH 预测结果显示, Chao 1910 基因组中缺少微囊藻毒素合成酶基因簇(*mcy*)。

2.4 铜绿微囊藻 Chao 1910 前噬菌体区域分析

整合在细菌基因组中的噬菌体序列被称为前噬菌体^[37]。经预测, Chao 1910 中含有 4 个可能的前噬菌体区域, 分别在基因组的 1 213 265–1 218 544 区域、2 151 583–2 161 061 区域、2 628 118–2 635 167 区域和

4 367 789–4 376 745 区域。其中在 4 367 789–4 376 745 区域可注释得到少量噬菌体结构蛋白, 在另外 2 个区域中发现了蓝藻噬菌体相似蛋白, 预测所得的其他蛋白均为转座子蛋白和功能未知的假想蛋白。

在 4 367 789–4 376 745 区域中, 有两段基因所编码的氨基酸序列与芽孢杆菌噬菌体 BCD7 中同一个尾鞘蛋白不同区段相似性较高; 其中, Chao 1910 中 M8120_21825 和 M8120_21825 基因所编码序列与 BCD7 假想尾鞘蛋白(YP_007005944.1)的氨基酸序列相似性分别为 28.68%和 36.22%。

此外, 2 151 583–2 161 061 区域与噬菌体 PaV-LD 有 2 个相似的片段: Chao 1910 中的 M8120_10810 基因所编码序列与噬菌体 PaV-LD 中的 type II toxin-antitoxin system HicA family toxin (YP_004957304.1)氨基酸序列有 46.15%的相似性; M8120_10820 基因所编码序列与噬菌体 PaV-LD 中的 type II toxin-antitoxin system HicB family antitoxin (YP_004957303.1)氨基酸序列有 41.27%的相似性。2 628 118–2 635 167 区域中的 M8120_13120 基因所编码序列与原绿球藻噬菌体 P-SSM2 中的假想蛋白(YP_214410.1)有 36.73%的氨基酸序列相似性。

表 3 铜绿微囊藻 Chao 1910 次级代谢产物合成基因簇

Table 3 Secondary metabolite synthesis gene clusters in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910

The region No.	The product types	Initial location of the region in nucleotides	Terminal location of the region in nucleotides	Most similar known cluster	Similarity (%)
Region 1	hgIE-KS, NRPS, T1PKS	764 865	821 772	Nostophycin	18
Region 2	T1PKS, terpene	1 039 313	1 084 488	Calicheamicin	5
Region 3	Terpene	1 261 472	1 281 481	—	—
Region 4	Cyanobactin	1 403 700	1 424 408	Piricyclamide	33
Region 5	Spliceotide	1 490 238	1 513 521	—	—
Region 6	Terpene	1 712 080	1 733 987	—	—
Region 7	T1PKS	1 785 164	1 829 063	BE-43547A1	13
Region 8	Proteusin, RiPP-like	2 346 177	2 370 997	—	—
Region 9	NRPS	4 861 711	4 917 570	Micropeptin K139	37
Region 10	Lanthipeptide-class-v	5 482 637	5 524 934	—	—

—: Not be predicted.

2.5 铜绿微囊藻 Chao 1910 中心碳代谢通路

蓝藻的中心碳代谢途径主要包括糖酵解、糖异生、氧化磷酸化、卡尔文循环和光呼吸途径等^[38] (图 3)。

在三羧酸循环通路中,我们注释了琥珀酸半醛脱氢酶(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SSADH)基因,即 Chao 1910 藻株可能具有将琥珀酸半醛转化为琥珀酸的能力^[39]。但是我们未能注释此途径上游用于催化 α -酮戊二酸合成琥珀酰辅酶 A 的 α -酮戊二酸脱氢酶(2-oxoglutarate dehydrogenase, 2-OGDC)。类似的情况也出现在

大多数蓝藻的基因组注释结果中。此前有研究人员推测该途径上游的 2-OGDC 应当存在,后续生化实验结果表明上述蓝藻中的乙酰乳酸合成酶与 2-OGDC 具有相似功能^[39]。基于以上结果,我们用聚球藻 PCC 7002 藻株中的乙酰乳酸合成酶基因(SynPCC7002_A2770)所编码序列与 Chao 1910 基因组所编码的所有蛋白进行序列比对,发现 M8120_25735 基因所编码序列与 SynPCC7002_A2770 序列相似度高达 77.3%。我们由此推测 M8120_25735 基因所编码的蛋白在 Chao 1910 中可能发挥了类似 2-OGDC 的功能。

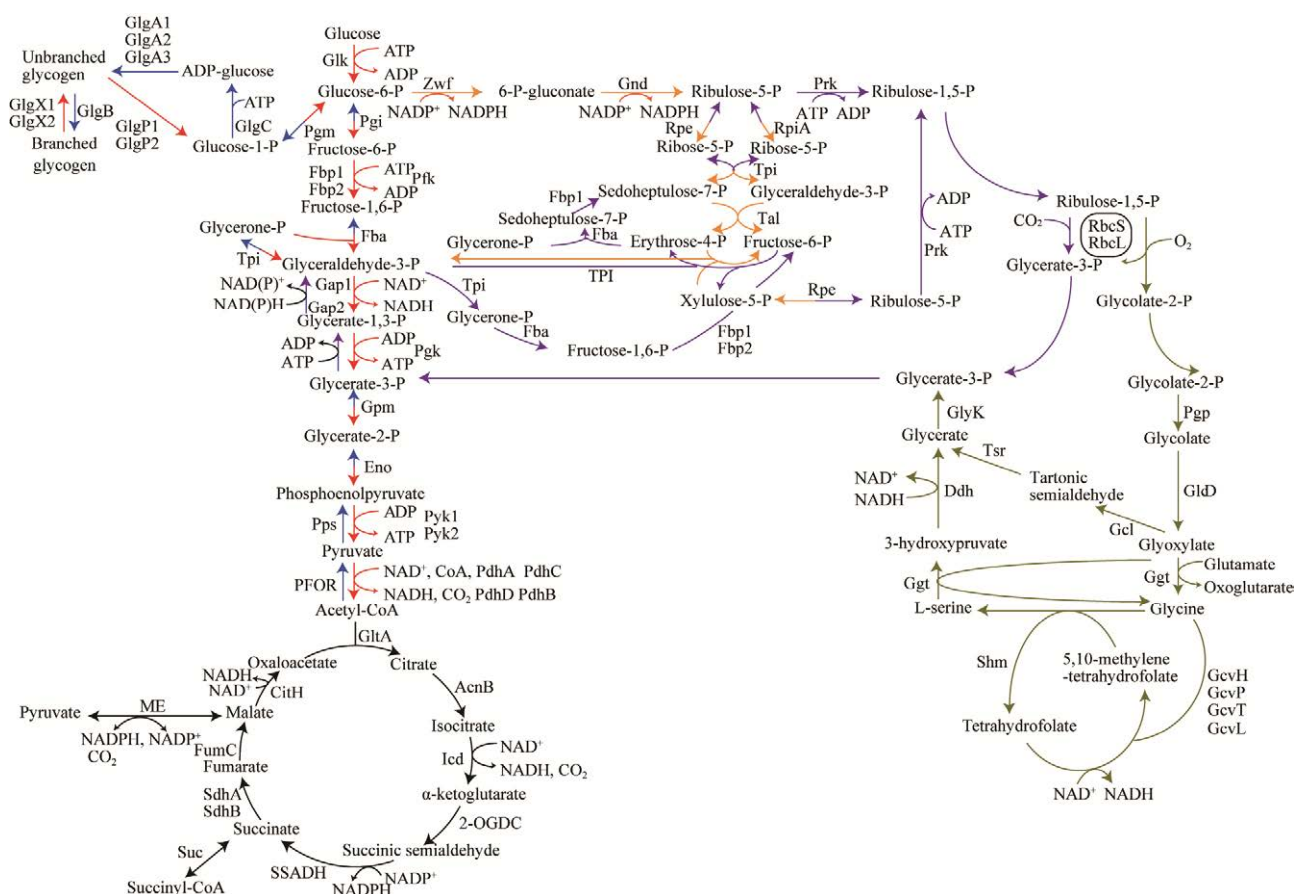


图 3 铜绿微囊藻 Chao 1910 中心碳代谢途径通路图 糖酵解和糖异生涉及的生物合成通路分别用红色和蓝色箭头显示,氧化磷酸化途径、光呼吸途径、卡尔文循环和三羧酸循环分别用橄榄绿、橙色、紫色和黑色箭头显示。除质子、水、氧和无机磷酸盐外,显示了每个反应中的辅助因子

Figure 3 Central carbon metabolism in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. The glycolysis and gluconeogenesis are shown with red and blue arrows, respectively. The oxidative phosphorylation pathway, photorespiration, Calvin cycle and tricarboxylic acid cycle are indicated by olive green, orange, purple and black arrows respectively. In addition to protons, water, oxygen and inorganic phosphates, cofactors in each reaction are shown.

2.6 铜绿微囊藻 Chao 1910 主要的磷代谢通路

对磷的高效吸收利用是铜绿微囊藻获取生存竞争优势的关键代谢通路。我们通过分析注释找到了 Chao 1910 藻株中与磷代谢通路相关的绝大多数蛋白。

2.6.1 微囊藻 Chao 1910 核苷酸合成通路

核苷酸是蓝藻细胞中重要的“磷储存库”，蓝藻细胞生命活动中磷的主要消耗方式之一就是合成核苷酸^[40]。

Chao 1910 具有完备的核苷酸合成通路。与大

多数原核生物一样，Chao 1910 经过磷酸戊糖途径生成 5-磷酸核糖，5-磷酸核糖通过酶促反应生成嘌呤和嘧啶的前体物质 5-磷酸核糖焦磷酸，随后经过一系列转变生成其他嘌呤核苷酸(图 4)。在嘧啶合成过程中，谷氨酰胺和碳酸氢盐通过氨甲酰磷酸合成酶合成氨甲酰磷酸；氨甲酰磷酸作为初始底物通过酶促反应生成乳清苷酸(orotidine-5-P)；乳清苷酸在 3 步酶促反应的催化下，分别生成 UMP、UDP 和 UTP；UTP 通过一系列酶促反应，依次生成 CTP 和 CDP；CDP 随后被催化产生 dCDP，并经过后续反应生成 dCTP 和 dCMP。

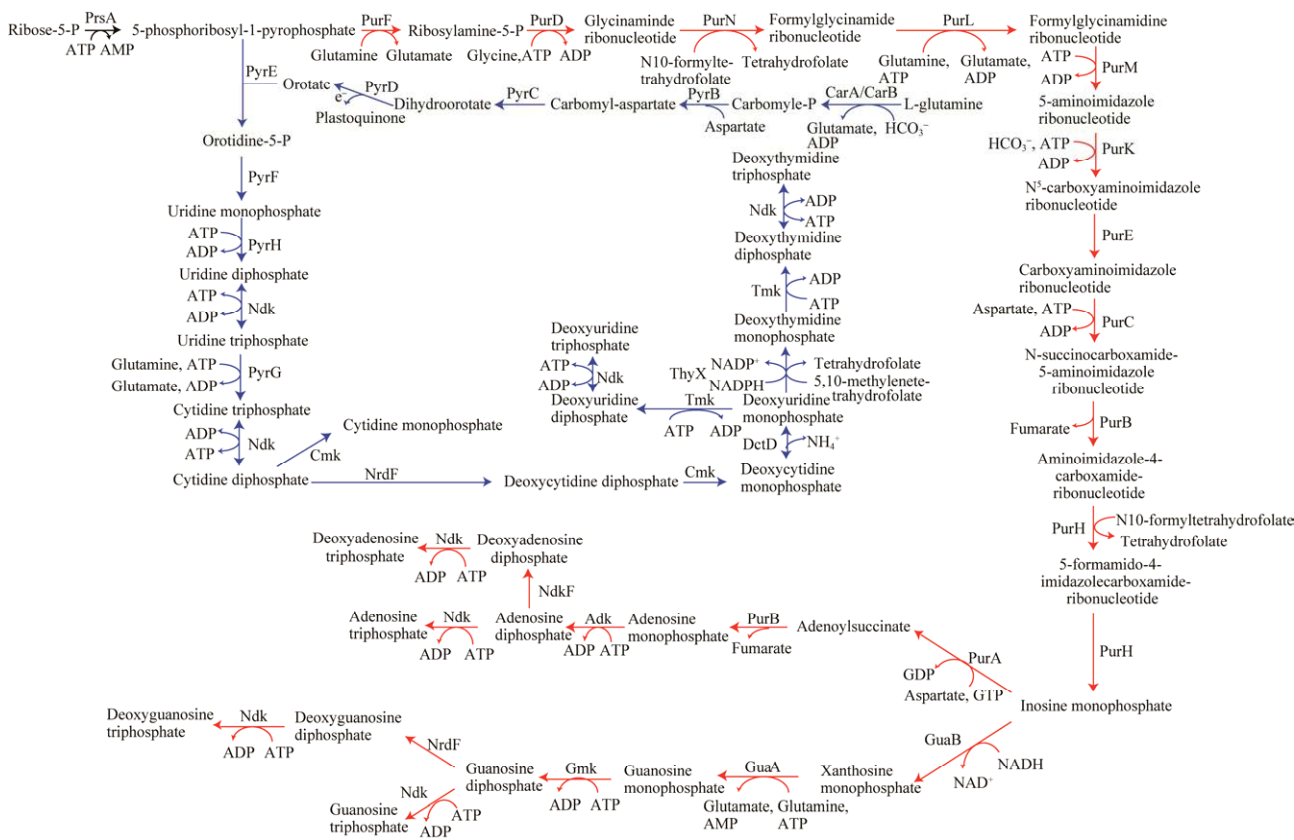


图 4 铜绿微囊藻 Chao 1910 核苷酸合成通路图 红色箭头连接的途径是嘌呤合成途径，蓝色箭头连接的是嘧啶合成途径。除质子、水、氧和无机磷酸盐外，显示了每个反应中的辅助因子

Figure 4 Nucleotide synthesis pathways in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. The red arrow connects to the purine synthesis pathway, and the blue arrow connects to the pyrimidine synthesis pathway. In addition to protons, water, oxygen and inorganic phosphates, cofactors in each reaction are shown.

2.6.2 铜绿微囊藻 Chao 1910 脂多糖合成前体的合成通路

在蓝藻等原核生物中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的生物合成需要多种核苷酸糖类前体作为原料。目前,在蓝藻中已鉴定出的脂多糖合成前体主要包括 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖、GDP- α -甘露糖、GDP- β -L-海藻糖、UDP-半乳糖、UDP-葡萄糖和 TDP- β -L-鼠李糖。在 Chao 1910 中,上述核苷酸糖合成通路中的绝大部分蛋白均较为保守,但蔗糖合成相关通路中有部分功能蛋白未能被注释(图 5)。

蓝藻中,蔗糖由 UDP-葡萄糖(或 ADP-葡萄糖)和 6-磷酸果糖通过蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SpsA)和蔗糖磷酸酶(sucrose phosphate phosphatase, Spp)两种酶合成,随后蔗糖被转化酶(invertase, Inv)分解产生葡萄糖和果糖,得到葡萄糖和果糖再被磷酸化为 6-磷酸葡

萄糖和 6-磷酸果糖,循环回到糖酵解过程。在 Chao 1910 基因组中,我们未能发现负责催化蔗糖合成的 SpsA 和 Spp 蛋白,也未注释 Inv 蛋白。但是,在 Chao 1910 基因组中我们已注释的 2 个 α -淀粉酶家族糖基水解酶(α -amylase family glycosyl hydrolase)均具备水解蔗糖生成葡萄糖和果糖的功能^[41-42],可以和葡萄糖激酶及果糖激酶组成完整的蔗糖分解利用通路。基于以上实验结果,我们推测 Chao 1910 中可能存在未鉴定的蔗糖合成相关基因。通过对 Chao 1910 基因组编码蛋白和多种蓝藻来源的 SpsA 及 Spp 氨基酸序列深度比较,我们发现 M8120_01680 基因所编码蛋白可能具有蔗糖磷酸酶催化功能(最高序列相似度为 28.4%),而另外有 15 个蛋白可能具有蔗糖磷酸合成酶功能(最高序列相似度为 28.6%)。然而上述蛋白的具体催化能力还需要进一步生物化学鉴定确认。

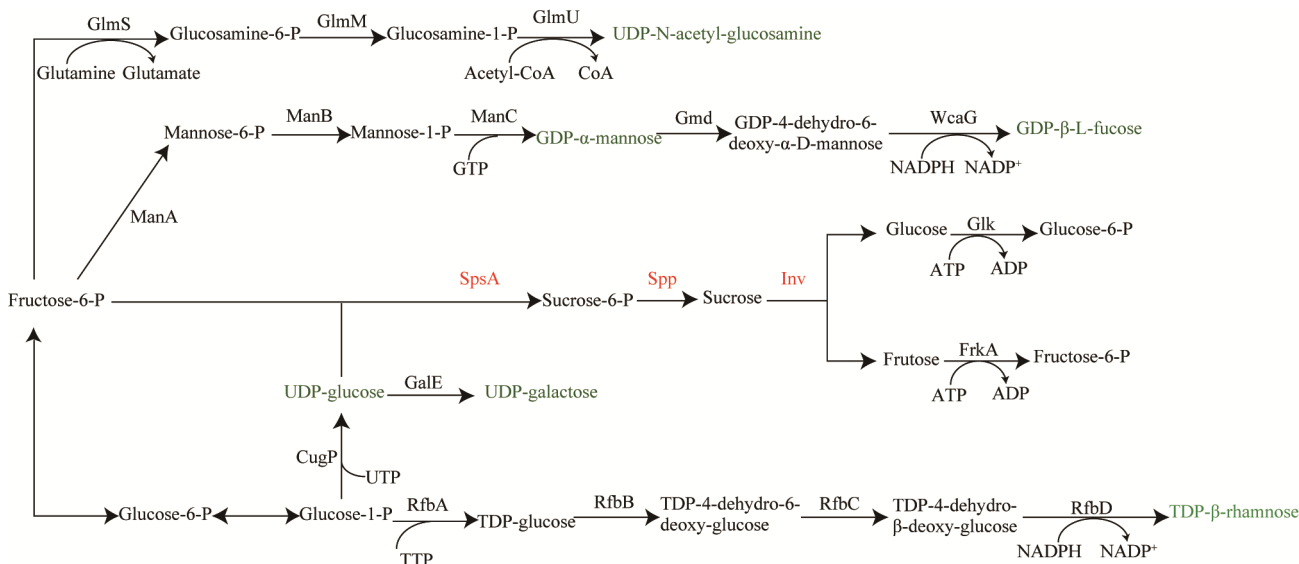


图 5 铜绿微囊藻 Chao 1910 脂多糖合成前体的合成通路 绿色突出显示的化合物是脂多糖生物合成的底物,红色显示的是铜绿微囊藻 Chao 1910 未注释得到的功能蛋白。除质子、水、氧和无机磷酸盐外,显示了每个反应中的辅助因子

Figure 5 The synthesis pathway of lipopolysaccharide precursors in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. The compounds highlighted in green are substrates for biosynthesis of LPS, while the unannotated proteins of *Microcystis aeruginosa* Chao 1910 are shown in red. In addition to protons, water, oxygen and inorganic phosphates, cofactors in each reaction are shown.

2.6.3 铜绿微囊藻 Chao 1910 肽聚糖和脂多糖的部分合成通路

磷脂是组成细菌生物膜的重要成分，也是铜绿微囊藻磷代谢的重要组成部分。目前蓝藻生物膜的成分研究仍处于起步阶段，且不同铜绿微囊藻生物膜的组成成分存在很大差异。在 Chao 1910 基因组分析中，我们仅注释了肽聚糖和脂多糖的部分合成通路(图 6)。相关基因的完整注释，有待在后续获得更多参考信息后继续完善。

2.6.4 铜绿微囊藻 Chao 1910 用于适应环境中磷含量变化的代谢通路

基因组注释结果显示, Chao 1910 藻株中包含有多种适应不同磷营养条件的代谢通路相关基因, 主要包括: 高亲和力无机磷转运系统复合物相关基因(图 7A)、多聚磷酸合成及分解相关基因(图 7B)以及对磷浓度感应及调节的双组分系统基因(图 7C)。根据已有蓝藻适应磷胁迫的代谢通路, 我们绘制了 Chao 1910 适应外界环境磷浓度波动的调控通路图(图 7D 和图 7E)^[18,43-48]。

Chao 1910 调控磷元素代谢的方式可能为: PhoU 蛋白(phosphate-specific transport system accessory protein)感应到外界环境中无机磷(Pi)含量降低,并将该信号传递给 SphS 蛋白,使

SphS 自身磷酸化并发挥激酶作用, 将 SphR 蛋白磷酸化。磷酸化后的 SphR 蛋白作为调节子上调无机磷酸盐转运系统、碱性磷酸酶 PhoX 基因及其他基因的转录, 提升蓝藻在环境中摄取 Pi 的能力。同时, 为应对外界磷缺乏情况, 蓝藻细胞内部储存的多聚磷酸盐(polyP)会被重新分解成 Pi, 供给代谢所需。当磷饥饿状态持续时间过长, 蓝藻细胞会降解大部分 RNA, 并将分解所得 Pi 用于更关键的基本生命维持通路(图 7D); 而在外界磷充足的情况下, PhoU 蛋白会抑制 SphS-SphR 系统相关蛋白活性, 降低 *pho* 调控子基因的转录, 从而防止无机磷酸盐转运系统过量摄入磷酸盐, 同时细胞也会重新开始积累 polyP (图 7E)。

在分析 Chao 1910 适应外界环境磷浓度波动调控通路的过程中,我们未能注释碱性磷酸酶蛋白 PhoX 编码基因;结合最新文献[49-50],我们将 Chao 1910 基因组所编码的全部蛋白序列与铜绿微囊藻 PCC 7806 的 PhoX 蛋白氨基酸序列进行了比对,发现 Chao 1910 中 M8120_17625 基因所编码的蛋白与该 PhoX 蛋白氨基酸序列相似性高达 97.82% (图 8A);我们进一步将 M8120 17625

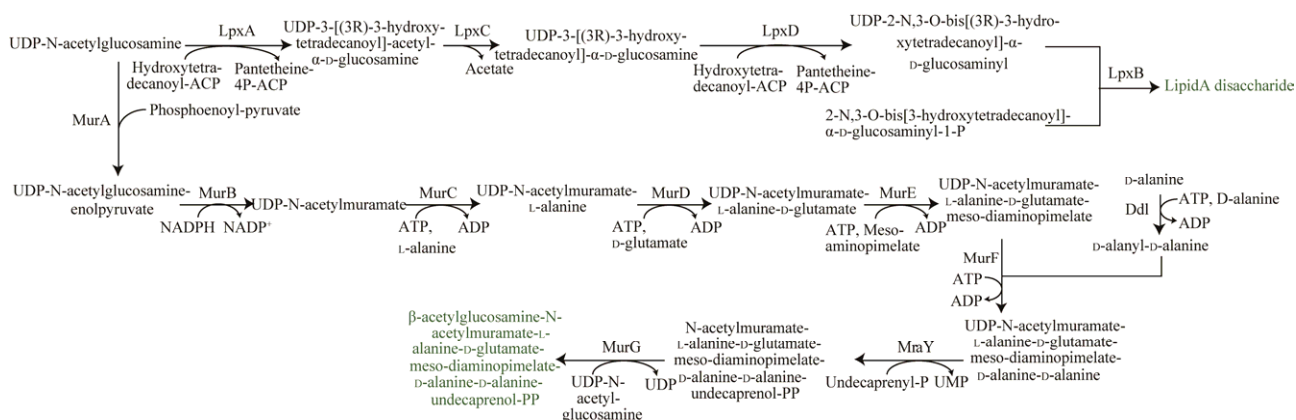


图6 铜绿微囊藻 Chao 1910 肽聚糖、脂多糖部分合成通路图 除质子、水、氧和无机磷酸盐外,显示了每个反应中的辅助因子

Figure 6 Partial synthesis pathway of peptidoglycan and lipopolysaccharide in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. In addition to protons, water, oxygen and inorganic phosphates, cofactors in each reaction are shown.

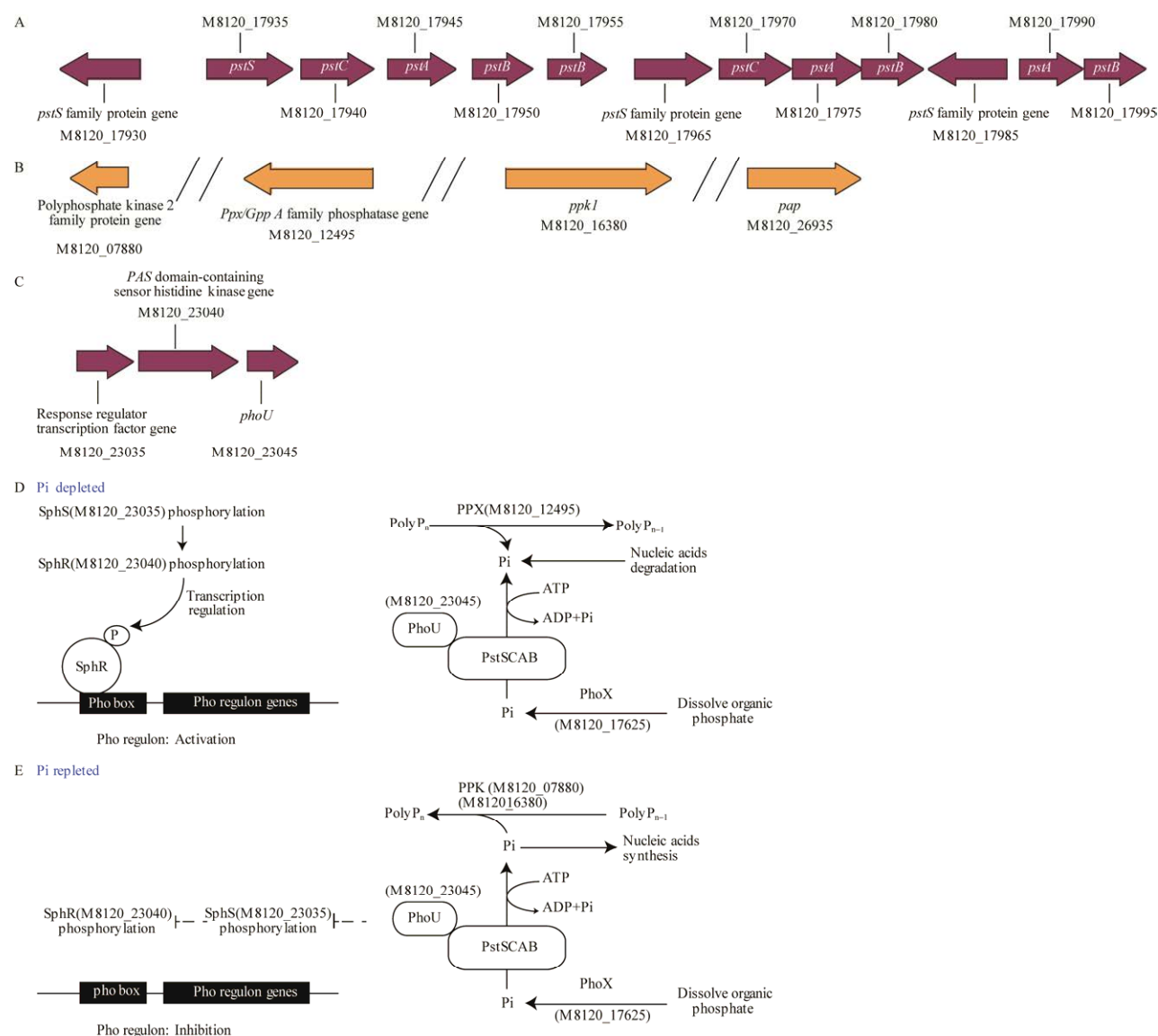


图7 铜绿微囊藻 Chao 1910 适应环境中磷含量变化的代谢通路图及相关基因 A: 高亲和力无机磷转运系统复合物相关基因及对应的编号. B: 多聚磷酸合成和分解相关基因及对应的编号. C: 对磷浓度感应及调节的双组分系统基因及对应的编号. D: Chao 1910 适应环境中磷含量不足时的调控通路图及相关蛋白, 蛋白对应编码基因的编号被标注在括号中. E: Chao 1910 适应环境中磷含量充足时的调控通路图及相关蛋白, 蛋白对应编码基因的编号标注在括号中

Figure 7 Metabolic pathway and related genes of adapting to external phosphate content in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910. A: Genes associated with the high affinity inorganic phosphate transport system and their corresponding numbers. B: Genes related to the synthesis and decomposition of polyphosphate and their corresponding numbers. C: Two-component system genes for phosphate sensing, regulation and their corresponding numbers. D: The regulatory pathways and related proteins of Chao 1910 in response to phosphate deficiency. The numbers of genes encoding the proteins are indicated in parentheses. E: The regulatory pathways and related proteins of Chao 1910 when phosphate content is sufficient. The numbers of genes encoding proteins are indicated in parentheses.

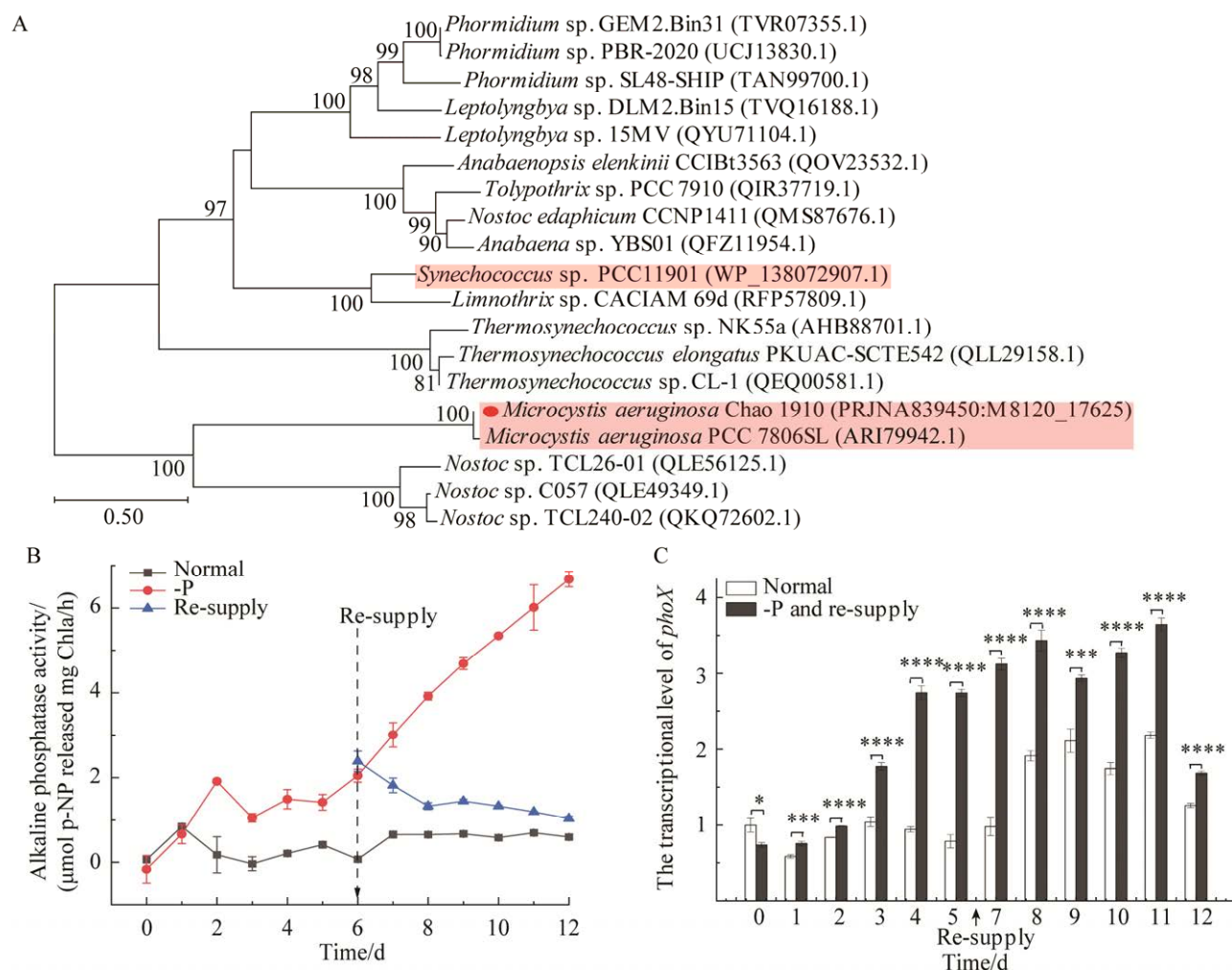


图8 铜绿微囊藻 Chao 1910 中 PhoX 系统发育分析及实验验证 A: 基于 PhoX 蛋白氨基酸序列构建的 Chao 1910 与其他不同蓝藻的 neighbor-joining 系统发育树, 括号中的数字为藻株 PhoX 蛋白的 GenBank 登录号; 分支点上的数字为自展值, 代表该分支结构的可信度; 底部的比例尺为进化距离标尺, 标尺上的数字代表标尺长度线段的序列差异度; 红框标注出的 PhoX 蛋白已通过实验证实其功能。B: Chao 1910 藻株在正常培养、缺磷培养及无磷培养 6 d 后补磷培养情况下的碱性磷酸酶活性变化。C: Chao 1910 藻株在正常和无磷培养 6 d 后补磷培养情况下 *phoX* 基因转录水平的变化情况, 每组数据的测定都经过 3 次独立重复实验($n=3$), 显著性差异分析采用的是 one-way ANOVA. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$ 。下同

Figure 8 *Microcystis aeruginosa* Chao 1910 PhoX phylogenetic analysis and validation. A: Neighbor-joining phylogenetic tree of Chao 1910 and other different cyanobacteria based on PhoX amino acid sequence. The numbers in parentheses are the GenBank accession number of PhoX sequence. The numbers at the branch points are bootstrap values and represent the credibility of the branch. The scale bar at the bottom is the evolutionary distance scale and the numbers on the scale represent the sequence divergence. The function of PhoX protein shown in red box has been proved. B: Changes in alkaline phosphatase activity of Chao 1910 under normal culture, non-phosphate culture and phosphate supplementation culture after 6 days of phosphate deficiency. C: Changes in *phoX* gene transcriptional levels of Chao 1910 in normal culture and non-phosphate culture for 6 days. Each data point is the average of three independent experiments ($n=3$), and error bars represent the means \pm SD. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) is used for the comparison of statistical significance. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$. The same below.

基因所编码蛋白的氨基酸序列与其他 28 个蓝藻 PhoX 蛋白氨基酸序列进行了进化树分析,发现 M8120_17625 基因所编码的蛋白与多种已被实验证实具有碱性磷酸酶活性的 PhoX 蛋白(如聚球藻 PCC 11901、铜绿微囊藻 PCC 7806)均具有较近亲缘关系。因此,我们推测 M8120_17625 基因所编码的蛋白很可能就是 Chao 1910 中的碱性磷酸酶蛋白 PhoX。

此外,我们还通过磷胁迫实验验证了 Chao 1910 藻株在不同磷营养情况下的碱性磷酸酶活性变化(图 8B)和对应的 *phoX* 基因表达水平的变化情况(图 8C)。结果表明:在外界环境磷浓度变化过程中,Chao 1910 编码的 *phoX* 基因的表达水平与碱性磷酸酶活性的变化趋势基本一致。通过上述实验可以确定,M8120_17625 基因所编码的蛋白即为 Chao 1910 中 PhoX 蛋白。

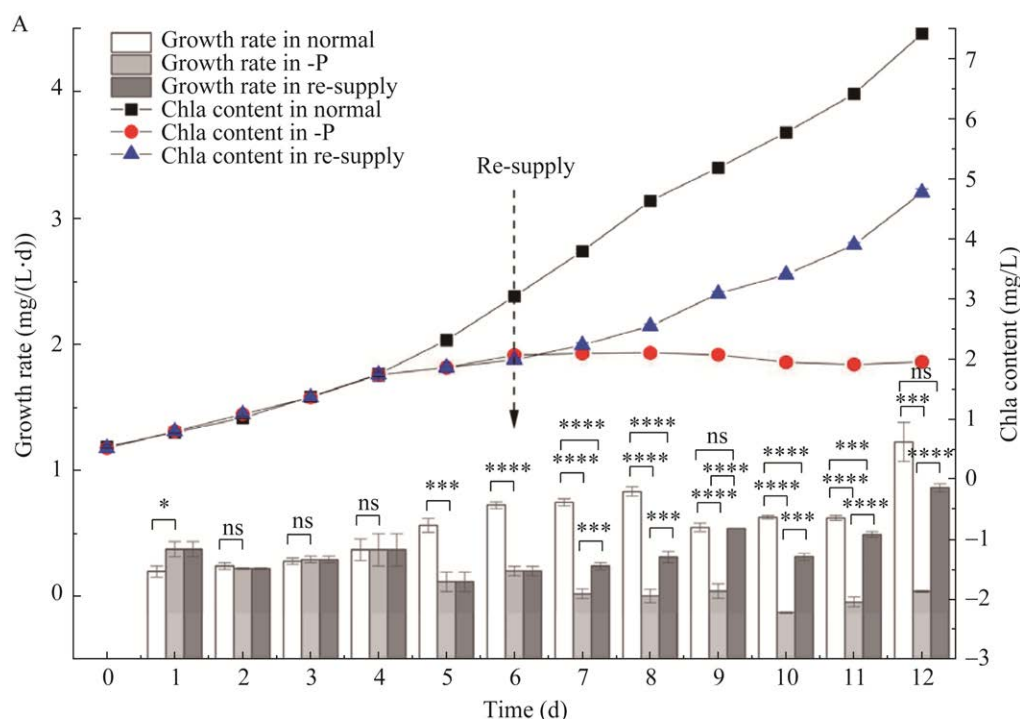
2.7 铜绿微囊藻 Chao 1910 磷胁迫条件下的生理变化及基因的转录情况

磷营养高效吸收是铜绿微囊藻获取生存竞争优势的重要能力,在已注释获得 Chao 1910 藻

株中完整的磷转运吸收相关通路基因基础上,我们进一步通过磷营养胁迫实验,验证了高亲和力无机磷酸盐结合蛋白 PstS 和多聚磷酸盐合成/分解蛋白 PPK/PPX 对应基因的转录水平随蓝藻内外环境磷浓度变化的不同调整情况。

通过叶绿素 a 含量测定,我们观察到相较于正常营养状况,磷胁迫条件下 Chao 1910 藻株生长速率显著下降;在无磷培养条件下饥饿 6 d 以后,Chao 1910 藻株即使重新回到正常磷营养水平后,生长速率依然低于原有水平,直到在正常营养条件下培养 6 d 后生长速率才能恢复到原有水平(图 9A)。

与上述生长情况对应的是,无机磷酸盐结合蛋白对应基因 *pstS* 转录水平在磷饥饿开始 2 d 后显著上升,至外界磷营养情况改善后迅速下降,但恢复磷营养条件 6 d 后, *pstS* 的转录水平仍为正常营养条件下转录水平的 2 倍。在磷饥饿条件下,Chao 1910 藻株中多聚磷酸盐合成蛋白 *ppk* 基因转录量未出现显著变化,多聚磷酸盐分解蛋白 *ppx* 基因转录量显著降低;但是,外界磷营养



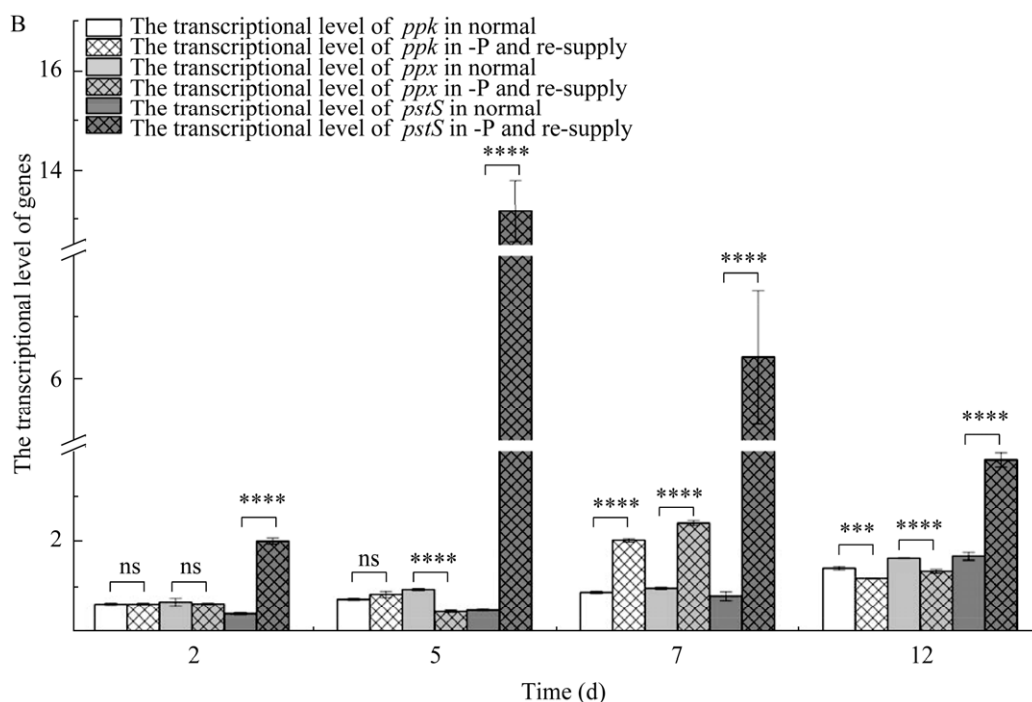


图9 铜绿微囊藻 Chao 1910 磷胁迫条件下的生理变化及基因的转录情况 A: Chao 1910 藻株在正常培养、缺磷培养及无磷培养 6 d 后补磷培养情况下叶绿素 a 含量和生长速率的变化. B: Chao 1910 藻株 *ppk*、*ppx*、*pstS* 在正常和无磷补磷条件下基因的转录情况

Figure 9 Physiological and gene transcription changes in *Microcystis aeruginosa* Chao 1910 under phosphorus stress. A: Changes in chlorophyll a content and growth rate of Chao 1910 under normal culture, non-phosphate culture and phosphate supplementation culture after 6 days of phosphate deficiency. B: Changes in *ppk*, *ppx* and *pstS* gene transcriptional levels of Chao 1910 in normal culture and phosphate supplementation culture after 6 days of phosphate deficiency.

情况改善后, *ppk* 与 *ppx* 转录水平均快速上升, 直到在正常营养条件下培养 6 d 后 2 个基因的转录水平才重新回到正常营养条件下的水平(图 9B)。

3 讨论与结论

铜绿微囊藻 Chao 1910 为巢湖首株完成全基因组序列测定的微囊藻藻株, 我们通过多层次的基因组数据分析, 完成了该藻株的基因组注释分析、系统发育信息分析、前噬菌体区域挖掘、次级代谢产物基因簇发现, 并对该藻株的中心碳代谢通路和主要磷代谢通路进行了重点分析。

Chao 1910 的亲缘关系树显示, 12 株微囊藻

聚类成了 2 个分离较远的簇, Chao 1910 与其他 7 种微囊藻位于同一发育树分支中, 与分离自日本霞浦淡水湖的铜绿微囊藻 NIES-843 的亲缘关系最近。根据聚类结果我们还发现, 物理距离和水系是否联通等因素, 对上述 12 株微囊藻亲缘关系远近影响有限; 结合两株分别来自南极和北极的 *Phormidium prostleyi* 蓝藻的 16S rRNA 基因的序列相似性高达 99%, 而另两株分别来自北美洲与亚洲的 *Microcoleus vaginatus* 蓝藻的 16S rRNA 基因序列也具有极高相似性这 2 个例证^[51-52], 我们推测蓝藻株系的扩散方式可能不仅限于水系和陆地传播两种方式, 另外地球几十亿年来的

板块变迁也有可能对当前的蓝藻分布情况产生巨大影响。

在 Chao 1910 基因组中, 我们预测得到了 10 个可能的次级代谢产物合成基因簇, 但由于与已知次级代谢产物合成基因簇相似性较低, 其产物及功能尚待进一步研究确认^[53-55]。另外, Chao 1910 基因组中未能找到负责微囊藻毒素合成的基因簇(*mcy*)。截至 2018 年的统计数据表明, 有 66.4% 铜绿微囊藻不产微囊藻毒素^[56], 而这些不产微囊藻毒素的藻株在水华暴发晚期占主导地位^[8,57], 这一结果与 Chao 1910 分离自 2019 年 10 月巢湖水华晚期这一时间点相一致。上述结果表明, Chao 1910 很可能不需要合成微囊藻毒素来抑制其他浮游生物的生长, 而可以借助其他生理特性获得生存竞争优势。

铜绿微囊藻基因组中通常含有大量的可移动 DNA 元件, 其中一些可能来源于与噬菌体之间的基因水平转移或者溶原整合^[58-60]。在 Chao 1910 基因组中我们找到了 4 个可能的前噬菌体区域, 这些区域编码的蛋白与多种噬菌体的结构蛋白、转座酶以及功能未知蛋白存在不同程度的相似性, 但是这些区域并未找到与噬菌体溶原相关的基因。因此, 我们推测上述前噬菌体区域基因可能来自其他环境微生物之间的水平转移。有研究表明, 芽孢杆菌可以抑制铜绿微囊藻的生长^[61-63], 在 Chao 1910 前噬菌体区域找到了芽孢杆菌噬菌体的结构基因, 提示芽孢杆菌与 Chao 1910 藻株在生长过程中可能存在竞争关系。

在 Chao 1910 主要磷代谢通路分析过程中, 我们发现这些通路相关蛋白在该藻株中相对保守, 但由于蓝藻基因组参考数据不足, 仍有部分通路蛋白未被注释。很多在蔗糖的合成及分解通路方面, 有文献认为淡水铜绿微囊藻中缺少蔗糖代谢相关基因, 而只有分离于咸水湖中的铜绿微

囊藻(如 PCC 7806、Sj 和 NIES-1211)才需要依靠蔗糖代谢对抗咸水带来的高渗透压力^[56]。然而, 我们通过同工酶分析, 在 Chao 1910 基因组中顺利补足了完整的蔗糖合成、分解以及后续生物利用相关的全部功能基因, 提示淡水来源的微囊藻中同样具备完整的蔗糖代谢通路。我们按照类似思路, 在淡水铜绿微囊藻 NIES-843 藻株中注释得到可以水解蔗糖的 α -淀粉酶家族蛋白(BAG05287.1); 在淡水铜绿微囊藻 FACHB-905 藻株中注释了负责蔗糖合成第二步催化反应的磷酸蔗糖磷酸酶(UGS08338.1)和负责蔗糖水解的 UDP-葡萄糖果糖糖基转移酶(UGS08337.1)。上述结果表明, 淡水铜绿微囊藻可能同样具备完整的蔗糖代谢通路, 只是对蔗糖的需求量相较于咸水中的藻株较小, 所以相关功能可由同工酶代为行使。

通过磷营养缺乏条件下的基因转录水平检测, 我们发现在感受到环境中磷营养匮乏信号后, 碱性磷酸酶 *phoX* 和无机磷酸盐结合蛋白 *pstS* 基因的转录水平迅速上调; 在外界环境磷营养水平恢复后, 其转录量仍会在较高水平保持一段时间。然而在接收到磷营养匮乏信号后, 多聚磷酸盐合成蛋白 *ppk* 转录水平未发生变化, 而多聚磷酸盐分解蛋白 *ppx* 转录水平显著下降; 外界磷营养供应恢复后, *ppk* 和 *ppx* 转录水平均显著上升, 直到正常培养 6 d 后, 其转录量才降回原有正常水平。结合上述蛋白的生理功能及磷胁迫条件下的 Chao 1910 生长速率变化情况, 我们推测: 外界磷匮乏信号可以迅速启动 *phoX* 和 *pstS* 的转录及表达, 从而迅速提升 Chao 1910 从外界环境中摄取磷营养的能力; 同时通过降低 *ppx* 转录水平, 降低细胞内多聚磷酸盐消耗量, 为迎接可能的磷饥饿做好准备。外界磷营养供给恢复后, 细胞内部的磷饥饿信号和外界磷营养信号共同调整上述蛋白的转录水平, 首先通过较高的

phoX、*pstS*、*ppk* 表达水平, 快速摄取外界磷营养并以多聚磷酸盐形式储存在 Chao 1910 细胞中; 然后提升 *ppx* 表达量, 释放一部分多聚磷酸盐中的磷营养供蓝藻细胞复制、分裂^[64]; 直到完成磷营养的“奢侈吸收”阶段后, *ppk* 和 *ppx* 转录水平回复到正常状态, 而 *phoX* 和 *pstS* 的表达量也逐渐向原有水平回调, 完成此次磷饥饿应激反应。

我们的工作拓展了巢湖蓝藻株系的全基因组数据库, 揭示了铜绿微囊藻 Chao 1910 高效吸收利用磷营养的部分分子机制, 为深入理解铜绿微囊藻成为巢湖水华优势藻株的原因提供了依据。

REFERENCES

- [1] de MARAIS DJ. Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth?[J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1703-1705.
- [2] SCHIRMEISTER BE, GUGGER M, DONOGHUE PC. Cyanobacteria and the great oxidation event: evidence from genes and fossils[J]. *Palaeontology*, 2015, 58(5): 935-936.
- [3] HARKE MJ, STEFFEN MM, GOBLER CJ, OTTEN TG, WILHELM SW, WOOD SA, PAERL HW. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp.[J]. *Harmful Algae*, 2016, 54: 4-20.
- [4] PÉREZ-CARRASCAL OM, TERRAT Y, GIANI A, FORTIN N, GREER CW, TROMAS N, SHAPIRO BJ. Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 2887-2900.
- [5] CARMICHAEL WW. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72(6): 445-459.
- [6] LEZCANO MÁ, AGHA R, CIRÉS S, QUESADA A. Spatial-temporal survey of *Microcystis* oligopeptide chemotypes in reservoirs with dissimilar waterbody features and their relation to genetic variation[J]. *Harmful Algae*, 2019, 81: 77-85.
- [7] PEARSON LA, CROSBIE ND, NEILAN BA. Distribution and conservation of known secondary metabolite biosynthesis gene clusters in the genomes of geographically diverse *Microcystis aeruginosa* strains[J]. *Marine and Freshwater Research*, 2020, 71(5): 701-716.
- [8] GOBLER CJ, BURKHOLDER JM, DAVIS TW, HARKE MJ, JOHNGEN T, STOW CA, van de WAAL DB. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms[J]. *Harmful Algae*, 2016, 54: 87-97.
- [9] van WICHELEN J, VANORMELINGEN P, CODD GA, VYVERMAN W. The common bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* is prone to a wide array of microbial antagonists[J]. *Harmful Algae*, 2016, 55: 97-111.
- [10] REYNOLDS CS, WALSBY AE. Water-blooms[J]. *Biological Reviews*, 1975, 50(4): 437-481.
- [11] KITCHENS CM, JOHNGEN TH, DAVIS TW. Establishing spatial and temporal patterns in *Microcystis* sediment seed stock viability and their relationship to subsequent bloom development in Western Lake Erie[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0206821.
- [12] WELKER M, ŠEJNOHOVÁ L, NÉMETHOVÁ D, DÖHREN H, JARKOVSKÝ J, MARŠÁLEK B. Seasonal shifts in chemotype composition of *Microcystis* sp. communities in the pelagial and the sediment of a shallow reservoir[J]. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52(2): 609-619.
- [13] GER KA, URRUTIA-CORDERO P, FROST PC, HANSSON LA, SARNELLE O, WILSON AE, LÜRLING M. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world[J]. *Harmful Algae*, 2016, 54: 128-144.
- [14] SEDMAK B, KOSI G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation[J]. *Journal of Plankton Research*, 1998, 20(4): 691-708.
- [15] 张民, 史小丽, 阳振, 陈开宁. 2012–2018 年巢湖水质变化趋势分析和蓝藻防控建议[J]. *湖泊科学*, 2020, 32(1): 11-20.
ZHANG M, SHI XL, YANG Z, CHEN KN. The variation of water quality from 2012 to 2018 in Lake Chaohu and the mitigating strategy on cyanobacterial blooms[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2020, 32(1): 11-20 (in Chinese).
- [16] 张民, 史小丽, 阳振, 陈开宁. 太湖和巢湖中微囊藻 (*Microcystis*) 与长孢藻 (*Dolichospermum*) 的长时序变化及其驱动因子[J]. *湖泊科学*, 2021, 33(4): 1051-1061.
ZHANG M, SHI XL, YANG Z, CHEN KN. Characteristics and driving factors of the long-term shifts between *Microcystis* and *Dolichospermum* in Lake Taihu and Lake Chaohu[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2021, 33(4): 1051-1061 (in Chinese).

- [17] JACKREL SL, WHITE JD, EVANS JT, BUFFIN K, HAYDEN K, SARNELLE O, DENEFF VJ. Genome evolution and host-microbiome shifts correspond with intraspecific niche divergence within harmful algal bloom-forming *Microcystis aeruginosa*[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(17): 3994-4011.
- [18] ALLEN MM. Cyanobacterial cell inclusions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1984, 38: 1-25.
- [19] KROMKAMP J, van den HEUVEL A, MUR LR. Phosphorus uptake and photosynthesis by phosphate-limited cultures of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *British Phycological Journal*, 1989, 24(4): 347-355.
- [20] SANTOS-BENEIT F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 402.
- [21] SANZ-LUQUE E, BHAYA D, GROSSMAN AR. Polyphosphate: a multifunctional metabolite in cyanobacteria and algae[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 938.
- [22] RACHEDI R, FOGLINO M, LATIFI A. Stress signaling in cyanobacteria: a mechanistic overview[J]. *Life: Basel, Switzerland*, 2020, 10(12): 312.
- [23] WAN LL, CHEN XY, DENG QH, YANG L, LI XW, ZHANG JY, SONG CL, ZHOU YY, CAO XY. Phosphorus strategy in bloom-forming cyanobacteria (*Dolichospermum* and *Microcystis*) and its role in their succession[J]. *Harmful Algae*, 2019, 84: 46-55.
- [24] GANF GG, OLIVER RL. Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake[J]. *The Journal of Ecology*, 1982, 70(3): 829.
- [25] GRILLO JF, GIBSON J. Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1979, 140(2): 508-517.
- [26] STANIER RY, KUNISAWA R, MANDEL M, COHEN-BAZIRE G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*)[J]. *Bacteriological reviews*, 1971, 35(2), 171-205.
- [27] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [28] MORIYA Y, ITOH M, OKUDA S, YOSHIKAWA AC, KANEHISA M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Web Server issue): W182-W185.
- [29] HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, HELLER D, HERNÁNDEZ-PLAZA A, FORSLUND SK, COOK H, MENDE DR, LETUNIC I, RATTEI T, JENSEN LJ, von MERING C, BORK P. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D309-D314.
- [30] STOTHARD P, WISHART DS. Circular genome visualization and exploration using CGView[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2005, 21(4): 537-539.
- [31] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [32] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [33] ARNDT D, GRANT JR, MARCU A, SAJED T, PON A, LIANG YJ, WISHART DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W16-W21.
- [34] ZAVREL T, SINETOVA M, ČERVENÝ J. Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria[J]. *BIO-PROTOCOL*, 2015, 5(9): e1467.
- [35] RAY JM, BHAYA D, BLOCK MA, GROSSMAN AR. Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(14): 4297-4309.
- [36] PINTO F, PACHECO CC, FERREIRA D, MORADAS-FERREIRA P, TAMAGNINI P. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34983.
- [37] FORTIER LC, SEKULOVIC O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens[J]. *Virulence*, 2013, 4(5): 354-365.
- [38] SMITH AJ, LONDON J, STANIER RY. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli[J]. *Journal of Bacteriology*, 1967, 94(4): 972-983.
- [39] ZHANG SY, BRYANT DA. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria[J]. *Science*, 2011, 334(6062): 1551-1553.
- [40] KARL DM. Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: new views of an old cycle[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2014, 6: 279-337.

- [41] POTOCKI de MONTALK G, REMAUD-SIMEON M, WILLEMOT RM, SARÇABAL P, PLANCHOT V, MONSAN P. Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties[J]. FEBS Letters, 2000, 471(2-3): 219-223.
- [42] PEREZ-CENCI M, SALERNO GL. Functional characterization of *Synechococcus* amylosucrase and fructokinase encoding genes discovers two novel actors on the stage of cyanobacterial sucrose metabolism[J]. Plant Science, 2014, 224: 95-102.
- [43] TETU SG, BRAHAMSHA B, JOHNSON DA, TAI V, PHILLIPPY K, PALENIK B, PAULSEN IT. Microarray analysis of phosphate regulation in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102[J]. The ISME Journal, 2009, 3(7): 835-849.
- [44] DYHRMAN ST, JENKINS BD, RYNEARSON TA, SAITO MA, MERCIER ML, ALEXANDER H, WHITNEY LP, DRZEWIANSKI A, BULYGIN VV, BERTRAND EM, WU ZJ, BENITEZ-NELSON C, HEITHOFF A. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33768.
- [45] GROSSMAN A. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment[J]. Protist, 2000, 151(3): 201-224.
- [46] GHORBEL S, KORMANEC J, ARTUS A, VIROLLE MJ. Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(2): 677-686.
- [47] HUDEK L, PREMACHANDRA D, WEBSTER WAJ, BRÄU L. Role of phosphate transport system component PstB1 in phosphate internalization by *Nostoc punctiforme*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(21): 6344-6356.
- [48] PITT FD, MAZARD S, HUMPHREYS L, SCANLAN DJ. Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(13): 3512-3523.
- [49] KATHURIA S, MARTINY AC. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 74-83.
- [50] HONG SJ, PAN QH, CHEN SY, ZU Y, XU CX, LI JH. Identification and characterization of alkaline phosphatase gene *phoX* in *Microcystis aeruginosa* PCC7806[J]. 3 Biotech, 2021, 11(5): 218.
- [51] DVOŘÁK P, HAŠLER P, POULÍČKOVÁ A. Phylogeography of the *Microcoleus vaginatus* (Cyanobacteria) from three continents: a spatial and temporal characterization[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e40153.
- [52] STRUNECKÝ O, ELSTER J, KOMÁREK J. Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions?[J]. Polar Biology, 2010, 33(10): 1419-1428.
- [53] GUPTA V, VYAS D. Antimicrobial effect of a cyclic peptide Nostophycin isolated from wastewater cyanobacteria, *Nostoc calcicola*[J]. Current Botany, 2021: 94-101.
- [54] FUJII K, SIVONEN K, KASHIWAGI T, HIRAYAMA K, HARADA KI. Nostophycin, a novel cyclic peptide from the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. 152[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1999, 64(16): 5777-5782.
- [55] NISHIZAWA T, UEDA A, NAKANO T, NISHIZAWA A, MIURA T, ASAYAMA M, FUJII K, HARADA KI, SHIRAI M. Characterization of the locus of genes encoding enzymes producing heptadepsipeptide micropeptin in the unicellular cyanobacterium *Microcystis*[J]. The Journal of Biochemistry, 2011, 149(4): 475-485.
- [56] TANABE Y, HODOKI Y, SANO T, TADA K, WATANABE MM. Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1150.
- [57] SINGH S, RAI PK, CHAU R, RAVI AK, NEILAN BA, ASTHANA RK. Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh water ponds[J]. Water Research, 2015, 69: 131-142.
- [58] FRANGEUL L, QUILLARDET P, CASTETS AM, HUMBERT JF, MATTHIJS HCP, CORTEZ D, TOLONEN A, ZHANG CC, GRIBALDO S, KEHR JC, ZILLIGES Y, ZIEMERT N, BECKER S, TALLA E, LATIFI A, BILLAULT A, LEPELLETIER A, DITTMANN E, BOUCHIER C, de MARSAC NT. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 274.

- [59] KANEKO T, NAKAJIMA N, OKAMOTO S, SUZUKI I, TANABE Y, TAMAOKI M, NAKAMURA Y, KASAI FM, WATANABE A, KAWASHIMA K, KISHIDA Y, ONO A, SHIMIZU Y, TAKAHASHI C, MINAMI C, FUJISHIRO T, KOHARA M, KATOH M, NAKAZAKI N, NAKAYAMA S, et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843[J]. DNA Research, 2007, 14(6): 247-256.
- [60] STOUGH JMA, TANG XM, KRAUSFELDT LE, STEFFEN MM, GAO G, BOYER GL, WILHELM SW. Molecular prediction of lytic vs lysogenic states for *Microcystis* phage: metatranscriptomic evidence of lysogeny during large bloom events[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184146.
- [61] KONG Y, WANG Y, MIAO LH, MO SH, LI JK, ZHENG X. Recent advances in the research on the anticyanobacterial effects and biodegradation mechanisms of *Microcystis aeruginosa* with microorganisms[J]. Microorganisms, 2022, 10(6): 1136.
- [62] LIU JY, YANG CY, CHI YX, WU DH, DAI XZ, ZHANG XH, IGARASHI Y, LUO F. Algicidal characterization and mechanism of *Bacillus licheniformis* Sp34 against *Microcystis aeruginosa* in Dianchi Lake[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(11): 1112-1124.
- [63] WU LS, GUO XL, LIU XL, YANG H. NprR-NprX quorum-sensing system regulates the algicidal activity of *Bacillus* sp. strain S51107 against bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1968.
- [64] SOLOVCHENKO A, GORELOVA O, KARPOVA O, SELYAKH I, SEMENOVA L, CHIVKUNOVA O, BAULINA O, VINOGRADOVA E, PUGACHEVA T, SCHERBAKOV P, VASILIEVA S, LUKYANOV A, LOBAKOVA E. Phosphorus feast and famine in cyanobacteria: is luxury uptake of the nutrient just a consequence of acclimation to its shortage?[J]. Cells, 2020, 9(9): 1933.