

杭州湘湖拉氏拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*) 藻株的分离及其特征研究

晁爱敏¹,于海燕¹,肖鹏²,李仁辉²

(1.浙江省环境监测中心 浙江省生态环境监测预警及质控研究重点实验室,杭州 310012;
2.温州大学 生命与环境科学学院,浙江 温州 325035)

摘要:拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis*)是一类具有固氮能力的丝状水华蓝藻,由于它可以产生拟柱孢藻毒素(Cylindrospermopsin,CYN)以及较强的入侵性,因此被广泛关注.在全球范围内,拟柱孢藻水华的暴发频率和范围显著增加.在中国,拟柱孢藻的分布呈现从东南沿海地区向内陆,从热带、亚热带向温带扩散的特点.目前国内仅发现两株产 CYN 藻株,均为 2012 年分离自杭州湘湖的藻株.2020 年 9 月从杭州湘湖分离到一新拟柱孢藻藻株,经形态学特征鉴定为拉氏拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*),基因测序表明该藻株和 2012 年分离自湘湖的一株有毒拟柱孢藻藻株的 16S rRNA 基因序列具有 3 个碱性的差异,和其他地区的拟柱孢藻的 16S rRNA 基因序列也表现出 99.5% 以上的相似性.通过对 CYN 合成基因片段的 *cyrA*,*cyrI* 和 *cyrJ* 的 PCR 检测,该藻株呈现阳性反应.经高效液相色谱(HPLC)化学检测,该藻株产 CYN 毒素,产毒量为 1 258.6 $\mu\text{g/g}$.研究结果丰富了我国产 CYN 的藻株库,在一定程度上也表明其具有环境适应性和稳定性.研究再次验证了产 CYN 的拟柱孢藻的检测方法,包括 DNA 检测及 HPLC 化学检测.湘湖作为杭州萧山重要的饮用水备用水源,建议在今后的水环境监测和管理中引入拟柱孢藻和 CYN 监测.

关键词:拉氏拟柱孢藻;形态学特征;拟柱孢藻毒素;Cyr;蓝藻水华;湘湖

中图分类号:X524

文献标志码:A

拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis*)是一种水华蓝藻类群,1972 年由 SEENAYYA 和 SUBBA RAJU 根据拉氏项圈藻(*Anabaenopsis raciborskii* Woloszyńska)末端异形胞的原生性(Primary)从项圈藻属(*Anabaenopsis*)分离出来,其模式种为拉氏拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)^[1].拟柱孢藻属的细胞内含有气囊(gas vesicle),此特征可以将它明显地区分于不含气囊的柱孢藻属(*Cylindrospermum*)^[2].拟柱孢藻和尖头藻(*Raphidiopsis*)在形态、生态位和分子系统上是高度相似的,以至于最近的蓝藻分类系统将拟柱孢藻合并到尖头藻属里.但这种分类观点需要一个较长的接受过程,本文依然采用拟柱孢藻属来描述.

1979 年发生在澳大利亚昆士兰州棕榈岛(Palm Island)上的居民集体暴发肝因性肠炎(Hepatoenteritis),流行病学调查表明这些患者的饮用水受到了拟柱孢藻水华污染.进一步的研究揭示了这种污染物的毒性和化学结构,并将其命名为拟柱孢藻毒素(Cylindrospermopsin,CYN),LD₅₀ 值约为 200 $\mu\text{g}/(\text{kg}$ 质量)^[3-5].自拟柱孢藻被重新定名及 CYN 被发现以来,拟柱孢藻水华事件在全球不断地被发现和报道,而且拟柱孢藻水华暴发范围和频率一直在增加^[6-10].但是大量的研究调查表明产 CYN 的拟柱孢藻的出现频率非常低,产 CYN 的拟柱孢藻株非常少.

在中国,LI 等^[11]首次在武汉鱼池中分离到弯形尖头藻(*R. curvata* HB1).该藻产的脱氧拟柱孢毒素(Deoxy-cylindrospermopsin,Deoxy-CYN)为拟柱孢毒素的一种衍生物.近年来拟柱孢藻在我国的分布和频

收稿日期:2021-02-17;修回日期:2021-05-30.

基金项目:浙江省生态环境科研和成果推广项目(2020HT0007);国家自然科学基金(31970219).

作者简介:晁爱敏(1979-),女,山东嘉祥人,高级工程师,研究方向为生物监测与评价、藻类预警监测,E-mail:chaoaimin@126.com.

通信作者:李仁辉,教授,E-mail:renhui.li@wzu.edu.cn.

率急剧增加,但研究人员分离的几百株拟柱孢藻藻株中,只有 JIANG 等^[12]报道了 2 株产 CYN 的拉氏拟柱孢藻(CHAB3438,CHAB3430),这 2 株拟柱孢藻均分离自杭州湘湖.路琰等^[13]报道了 10 株分离自广东千灯湖的拉氏拟柱孢藻,但仅一株产 Deoxy-CYN,无产 CYN 的藻株.目前我国正式报道的产 CYN 的拟柱孢藻藻株只有 2 个,均分离自杭州湘湖.

2020 年,对湘湖开展浮游植物调查,成功分离到拉氏拟柱孢藻藻株,通过形态观察、鉴定、DNA 序列测定以及 HPLC 化学检测等手段,再次确定该拟柱孢藻产 CYN.研究丰富了拟柱孢藻和 CYN 的研究材料,为研究拟柱孢藻和 CYN 的产生以及进化提供了基础材料.

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2020 年 9 月在杭州湘湖(30°8'42.75"N,120°13'32.27"E)跨湖桥采集浮游植物样品.其中浮游植物定性样品采用孔径 64 μm 浮游生物网采集,采集方法和分析方法均参照《水和废水监测分析方法(第四版 增补版)》中“浮游生物的测定”.采集的水体样品和浮游植物样品放在 4 °C 冷藏箱中保存,随后带回实验室分析.湘湖跨湖桥点位环境因子如下:水温 23.5 °C,pH 值 8.2,透明度 85 cm.总氮(TN)为 0.89 mg/L,总磷(TP)为 0.062 mg/L,叶绿素 a 质量浓度为 16.7 $\mu\text{g/L}$.

1.2 藻种的分离培养

采用毛细管分离法对湘湖跨湖桥浮游植物定性样品进行藻种分离.具体操作如下:在酒精灯下将巴斯德吸管做成毛细管;在 100 倍倒置显微镜下,用毛细管挑取拟柱孢藻单根藻丝,将藻丝移至无菌水中清洗 5~6 次;将藻丝转移至 24 孔细胞培养板中,培养板装有灭菌新鲜 CT 培养基;将培养板放入光照培养箱中培养,培养箱温度设置为 25 °C,光照强度为 25 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{S})$,光暗周期为 12L:12D.约 3 周后,可得到拟柱孢藻的纯藻种.藻种编号为 WZU10.

1.3 藻丝和藻细胞的细胞形态观察

使用 Zeiss Axiolab 5 光学显微镜对藻体形态进行观察,外接 1 100 万像素数码相机(Lighttools Camera 1000KPA)和数据处理系统进行图像和数据分析.随机选取 50 个以上的藻丝对藻细胞各项数据进行测量与统计.

1.4 藻细胞 DNA 提取和 16S rRNA 基因和 *Cyr* 基因序列的测定

纯化的藻株扩大培养后,参考 LIN 等^[14]的方法进行藻体基因组 DNA 的提取,用于扩增 16S rRNA 基因以及拟柱孢藻毒素 *Cyr* 基因片段.16S rRNA 基因扩增的引物为 F1 和 1494Rc,它们的序列以及拟柱孢藻毒素基因 *cyrA*,*cyrI* 和 *cyrJ* 的引物序列见表 1 所列.引物由上海英骏生物技术有限公司合成.PCR 反应体系为 50 μL ,包含 25 μL 2 \times Taqmix DNA 聚合酶(Takara, Japan),1 μL 正反向引物,1 μL DNA 样品和 22 μL 无菌去离子水.PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C

表 1 本研究的引物序列

Tab. 1 Primer sequences in this study

基因	引物名	序列(5'-3')	T _m /°C
16S rRNA	F1	TTGATCCTGGCTCAGGATGA	58
	1494Rc	TACGGCTACCTTGTTACGAC	
<i>cyrA</i>	cyrAF51	GATGGTTGTTCGGGATTGCAGAT	57
	cyrAR1167	GAAGCGAGAAACGCCATTGGT	
<i>cyrI</i>	cyrIF	CAGGCTTATCTGCAACAACATTTCT	56
	cyrIR813	CGGTTTATCAGTTCCAGAGTATCCA	
<i>cyrJ</i>	cyrJF13	CGAATCGCAATGTGGTCTGTGC	59
	cyrJR720	GACAAGATATAGCGCAACGACTCA	

变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后 72 °C 延伸 5 min.PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,通过胶回收试剂盒(BioFlux,China)回收,克隆到载体 pMD 18-T 上(Takara,Japan).将克隆载体转入感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中,阳性克隆送武汉艾康健生物科技有限公司进行双向测序.

1.5 分子系统学分析

将本研究所测到藻株的 16S rRNA 基因序列使用 NCBI 数据库中的在线 BLAST 获取同源序列,选择

已成功进行纯化培养的近缘物种的 16S rRNA 基因全长序列,用于系统进化树构建.将所有序列用 Muscle v3.8.31 软件进行序列对位排列^[15],使用 BioEdit v7.2.5 软件对排列结果进行人工校正,两端截齐并保留保守区^[16],然后将最终序列分别用 MEGA X v10.2.5,PhyML v3.0 和 MrBayes v3.2.7 软件分别构建邻接法(Neighbor Joining)、最大似然法(Maximum Likelihood)和贝叶斯法(Bayesian Inference)分子系统树^[17-20].其中邻接法选用 Kimura2 模型^[21],1 000 次自展值重复;最大似然法先用 SMS 算法中的 AIC 标准计算最优模型(GTR+G+I),再用 PhyML 基于最优模型进行 1 000 次自展重复^[22];贝叶斯法也选用 GTR 模型,运行 1 000 000 代,每 1 000 代取样,直到分割频率平均标准差小于 0.01,最后去掉 25% 的老化样本,用剩余样品构建系统树,用贝叶斯后验概率表示系统树分枝的支持率.所有 3 种系统树仅显示高于 60% 的自展重复值或后验概率,并且均以 *Chroococidiopsis cubana*, *Loriellopsis cavernicola*, *Synechococcus elongatus* 和 *Acaryochloris marina* 这 4 株藻的联合枝做外类群.

1.6 拟柱孢藻毒素的化学测定

将培养 3 周后的 10 mL 藻株培养液过滤在孔径为 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜(Millipore Sigma Inc., USA)上.膜上截留的细胞用于胞内 CYN 的提取,提取方法如下:将滤膜卷成圆筒状放入盛有 0.5 mL 氧化锆磁珠(直径 0.1 mm)的破碎管中.破碎管中加入 1 mL 双蒸水;将整理好的破碎管放入细胞破碎仪中进行破碎.条件为:4 $^{\circ}\text{C}$, 6.5 m/s, 破碎 1 min, 间歇 1 min, 共 8 个循环;破碎完成后,简短离心,条件为:70 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min.将上清液转移至干净 1.5 mL 离心管中,再次离心,条件为:10 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min;离心完毕后,用注射器吸取上清液,用 0.22 μm 的针式滤膜(聚醚砜, PES)进行初滤.初滤完成后,将滤液用超滤管(100 KD, 500 μL)进行超滤离心,条件为:8 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min.超滤完成后,将滤液转移至色谱瓶中,加入 4 μL 体积分数为 10% 三氟乙酸(TFA)水溶液(TFA 质量分数为 0.1%).CYN 的检测方法为高效液相色谱法,检测波长为 260 nm,色谱柱为 Phenomenex Synergi Polar-RP 色谱柱(型号:00G-4336-E0),流动相 A 为含有质量分数为 0.05% TFA 的双蒸水,流动相 B 为质量分数为 0.05% TFA,体积分数为 50% 甲醇.线性洗脱,0~10 min,体积分数为 10%~30% 流动相 B,等度维持 5 min,最后在 5 min 内升高至 100%.藻种 CYN 毒素的浓度通过与 CYN 标准品(ENSO life Sciences, USA)的停留时间和出峰面积进行比较计算,根据藻种的干质量换算成 $\mu\text{g/g}$.

2 结果

2.1 藻种的形态特征和鉴定

湘湖跨湖桥浮游植物优势种为直链藻(*Melosira*)和假鱼腥藻(*Pseudoanabaena*),并伴有拟柱孢藻和尖头藻的藻丝体.

通过镜检,确认 WZU10 藻株为单藻丝纯培养物.WZU10 藻株的藻丝形态如图 1 所示.该藻株呈现典型的拉氏拟柱孢藻的形态特征:藻丝浮游,单生,直形,没有发现弯形和螺旋形,藻丝周围无黏滞性胶鞘包裹;藻丝体横隔收缢明显,藻丝体两端略渐狭细;营养细胞含有气囊,细胞呈圆柱形,长 7.68 (最小值)~10.45 (平均值)~14.24 (最大值) μm ,宽 2.41 (最



图1 拟柱孢藻藻株WZU10的显微图片

Fig.1 Microscopic image of *Cylindrospermopsis raciborskii* WZU10 strain

小值)~3.42(平均值)~4.52(最大值) μm ,长宽比为1.95(最小值)~3.79(平均值)~5.32(最大值);藻异形胞顶生,在一条藻丝体有上单个或两个,异形胞形态呈圆锥形,长4.63(最小值)~8.21(平均值)~10.85(最大值) μm ,宽2.45(最小值)~3.21(平均值)~4.13(最大值) μm ,长宽比为1.81(最小值)~2.58(平均值)~3.61(最大值);厚壁孢子未观察到。

2.2 拟柱孢藻 WZU10 的 CYN 检测结果

根据表 1 中所列的 CYN 合成基因簇(*cyr*)的部分片段 *cyrA*, *cyrI* 和 *cyrJ* 的引物序列,利用拟柱孢藻 WZU10 藻株的基因组,成功地扩增并测序了这 3 个 *cyr* 基因片段,从分子特征上鉴定了 WZU10 藻株含有这 3 个 CYN 合成基因.在获得这 3 个 *cyr* 基因的阳性反应后,利用 HPLC 化学检测方法,进行胞内 CYN 的检测,显示了和标准品 CYN 一样停留时间的峰值,通过面积和干重的推算,WZU10 的胞内 CYN 质量分数为 1 258.6 $\mu\text{g/g}$,属于 CYN 较高产的藻株(表 2)。

表 2 产 CYN 和 deoxy-CYN 的拟柱孢藻藻株的 *cyr* 扩增和比较

Tab. 2 Comparison of *cyr* genes detection of CYN-and deoxy-CYN-producing

Cylindropermopsis raciborskii/*Raphidiopsis* strains

$\mu\text{g/g}$

藻株	分离地点	<i>cyrA</i>	<i>cyrI</i>	<i>cyrJ</i>	CYN	7-deoxy-CYN
<i>C. raciborskii</i> WZU10	浙江杭州湘湖(2020)	+	+	+	1 258.60	未检测
<i>C. raciborskii</i> CHAB3438	浙江杭州湘湖(2012)	+	+	+	2 637.00	109.00
<i>C. raciborskii</i> CHAB3445	浙江杭州湘湖(2012)	+	+	+	1 889.00	346.00
<i>Raphidiopsis curvata</i> HB1	湖北武汉关桥鱼池	+	+	+	0.00	462.00
<i>C. raciborskii</i> QDH7 ^[13]	广东佛山千灯湖	+	?	+	0.00	1 745.19

+:表明用分子方法检测出相应基因;?:表明不确定是否有检测。

2.3 分子系统学分析和分子鉴定

根据表 1 的 16S rRNA 基因的扩增引物,利用 WZU10 藻株的基因组 DNA,成功获得 PCR 产物.通过测序获得了 1 400 bp 长度的 DNA 序列.通过 NCBI 的 BLAST 检索,表明拉氏拟柱孢藻 WZU10 和 2012 年杭州湘湖分离的拉氏拟柱孢藻 CHAB3445 的 16S rRNA 基因序列完全相同,和 CHAB3438 具有 3 个碱基的差别,和其他拟柱孢藻藻株的 16S rRNA 相似度都在 99.5% 以上.截取了最大可使用的 1 225 bp 多重比对位点,构建系统发育树,其结果表明,WZU10 和其他拟柱孢藻/尖头藻藻株聚类在一起(图 2)。

3 讨 论

我国每年大范围的蓝藻水华暴发及所造成的危害引起了各级政府、科研人员以及广大居民的极大关注.大量研究表明,拟柱孢藻水华的暴发频率和范围在全球范围内是显著增加的,在中国表现的尤为突出^[23],拟柱孢藻的分布呈现从东南沿海地区向内陆,从热带、亚热带向温带扩散的规律^[10].我国许多地区出现了蓝藻水华种类演替现象,在某些地区表现为拟柱孢藻取代微囊藻成为新的蓝藻水华优势类群^[24].近年来,拟柱孢藻水华的研究在我国逐渐增多,而拟柱孢藻毒素(CYN)及产 CYN 蓝藻的相关报道和研究偏少.根据蒋永光^[25]报道,从全国分离的几百株拟柱孢藻/尖头藻藻株中,产 CYN/deoxy-CYN 的藻株的比例只有 2.2%,而产 CYN 的比例不到 1%.如此低的出现比例使得分离和培养产 CYN 藻种的工作变得更加困难,给拟柱孢藻的产毒特性、危害和产毒机理等研究造成较大影响.因此,寻找有毒的拟柱孢藻藻株也一直是蓝藻水华研究人员的重要目标。

本文对曾发现产 CYN 的杭州湘湖再次调查,又一次发现并分离到拟柱孢藻藻株.通过形态特征和 DNA 分子鉴定技术确定为拉氏拟柱孢藻(*C. raciborskii*).拟柱孢藻毒素合成基因簇分子检测呈阳性,HPLC 化学检测最终确认该藻株为产 CYN 的藻株.研究资料表明,2012 年拟柱孢藻为湘湖的水华蓝藻优势种类,且从水华样品中分离到的两株 *C. raciborskii* (CHAB3438 和 CHAB3440)是我国目前仅有的 2 株产 CYN 的藻株.本研究分离的 *C. raciborskii* WZU10 将是我国第 3 个产 CYN 的拟柱孢藻藻株,也是湘湖第 3 个产 CYN

的拟柱孢藻藻株。

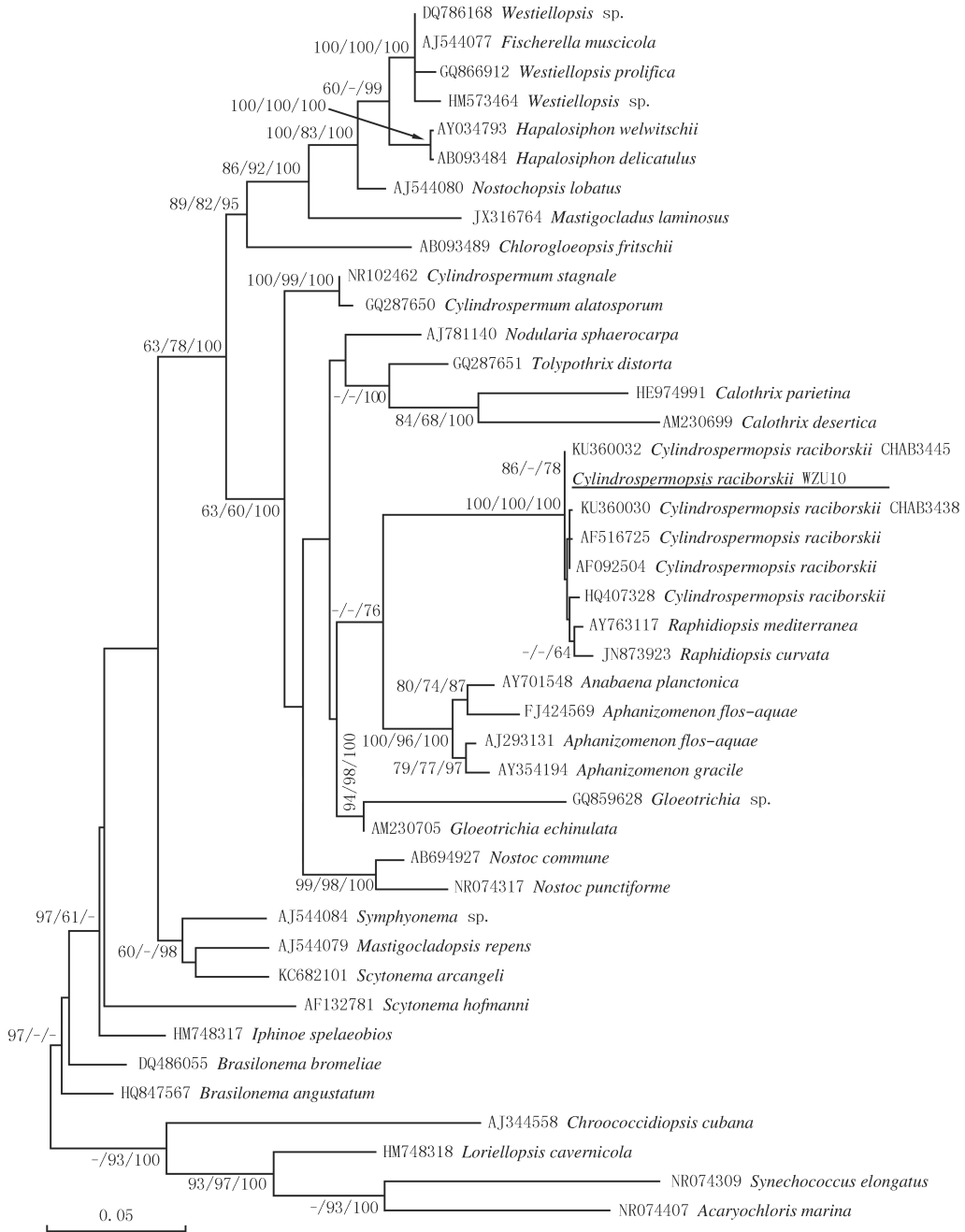


图2 拟柱孢藻藻株WZU10及其近缘种的分子系统树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Cylindrospermopsis raciborskii* WZU10 and its related species

湘湖位于萧山城区西南,钱塘江与浦阳江交汇的三江口附近,属典型的平原河网水系中的浅水性湖泊。北部连西小江、浙东运河,其水源补充主要依赖自然降水。尽管外来补水和换水作业时常进行,但整体处于相对静止状态,水体流速缓慢且存在水流交换盲区,水体物理自净能力较低。湘湖风景区每年接待近百万游客,给湘湖水生态环境保护带来影响。2012年湘湖水体中拟柱孢藻为优势种类,到2020年水体中拟柱孢藻生物量大幅度降低,说明湘湖近年来水环境治理取得了较好成效。尽管如此,治理措施下的水生态环境变化过程

通常是复杂而不稳定的.侯宝芹等^[26]对湘湖2016年12月到2017年11月期间的浮游植物调查表明,在2017年的7~8月,蓝藻生物量占比达90%以上,蓝藻细胞计数大于 10^8 个细胞数/升.我们在2020年9月湘湖浮游植物调查中发现,拟柱孢藻及其他蓝藻细胞数均大幅度降低,湘湖CYN毒素的污染风险相比于2012年有所降低,水体水质也基本上在Ⅲ类左右.但是拟柱孢藻依然存在,并且还是产CYN的拉氏拟柱孢藻,表明湘湖中CYN毒素的污染潜力仍然存在,应当受到持续关注.拟柱孢藻以入侵性强而著称,其在新环境中具有长期适应和生存的能力.拟柱孢藻的生长和暴发往往对水体的营养盐(如氮磷浓度)要求不高,如TN在1.0 mg/L以下,TP在0.05 mg/L左右或更低^[27].拟柱孢藻可产生厚壁孢子,厚壁孢子在不良环境的条件下形成并脱离藻丝沉降到底泥中长期存在,环境条件合适时再次萌发成新的藻丝体.

当一个水体暴发过拟柱孢藻水华或者水体中有少量拟柱孢藻的存在,研究水体是否受到潜在CYN污染的最好方法依然是单藻株的分离.得到单种培养的拟柱孢藻种后,确认藻丝体及其形态特征,利用拟柱孢藻纯培养物进行拟柱孢藻毒素合成基因 cyr 的分子检测和CYN的化学检测.根据蒋永光^[24]推荐的方案,首先进行 $cyrA$, $cyrI$ 和 $cyrJ$ 的PCR检测,得到三者的阳性结果后,再进行CYN的化学检测,如HPLC法或者LC-MS等方法,就可确定此藻株是否为产CYN藻株或者产deoxy-CYN藻株.由于目前全球范围内并没有deoxy-CYN的标准品,所以暂时没有检测deoxy-CYN.分子检测结合HPLC化学检测在本研究中再次得到应用.本研究的方法和结果可为我国湖库富营养化风险评估以及具有潜在拟柱孢藻风险的水体的水生态保护提供预防策略^[28],建议在今后的水环境和水生态监测中引入拟柱孢藻和CYN的检测项目,为保障饮用水安全提供科学支撑.

参 考 文 献

- [1] SEENAYYA G, SUBBARAJU N. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. In: Desikachary T. V. (Ed.), First international symposium on taxonomy and biology of blue-green algae[M]. Madras: Madras University, 1972.
- [2] HORECKÁ M, KOMÁREK J. Taxonomic position of three planktonic blue-green alga from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*[J]. Preslia, 1979, 51: 289-312.
- [3] BYTH S. Palm Island mystery disease[J]. The Medical Journal of Australia, 1980, 2(1): 40-42.
- [4] HAWKINS P R, RUNNEGAR M T, JACKSON A, et al. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(5): 1292-1295.
- [5] OHTANI I, MOORE R E, RUNNEGAR M T. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1992, 114(20): 7941-7942.
- [6] CHAPMAN A D, SCHELSKE C L. Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes[J]. Journal of Phycology, 1997, 33: 191-195.
- [7] PADISÁK J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding highly adaptive cyanobacterium; worldwide distribution and review of its ecology[J]. Archiv für Hydrobiologie, 1997, 107(4): 563-593.
- [8] BRIAND J F, LÉBOULANGER C, HUMBERT J F, et al. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming?[J]. Journal of Phycology, 2004, 40(2): 231-238.
- [9] GEMELGO M C, SANTANNA C L, TUCCI A, et al. Population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju, a Cyanobacteria toxic species, in watersupply reservoirs in São Paulo, Brazil[J]. Hoehnea, 2008, 35(2): 297-307.
- [10] XIE J L, YU G L, XU X D, et al. The morphological and molecular detection for the presence of toxic *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria) in Beijing city, China[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36: 263-272.
- [11] LI R H, CARMICHAEL W W, BRITAIN S, et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria)[J]. Journal of Phycology, 2001, 37(6): 1121-1126.
- [12] JIANG Y G, XIAO P, YU G L, et al. Sporadic distribution and distinctive variations of cylindrospermopsin genes in cyanobacterial strains and environmental samples from Chinese freshwater bodies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(17): 5219-5230.
- [13] 路琰, 雷敏婷, 叶金梅, 等. 广东千灯湖拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)的形态和产毒能力的株间差异及系统进化[J]. 湖泊科学, 2020, 32(1): 144-153.
LU Y, LEI M T, YE J M, et al. Intraspecific variation of morphological traits and toxin-producing capacity and phylogenetic analysis for *Cylindrospermopsis raciborskii* from Qiandenghu Lake, Guangdong Province[J]. Journal of Lake Sciences, 2020, 32(1): 144-153.
- [14] LIN S, SHEN J, LIU Y, et al. Molecular evaluation on the distribution, diversity and toxicity of *Microcystis* (Cyanobacteria) species from

- Lake Ulungura—a mesotrophic brackish desert lake in Xinjiang, China[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, 175: 139-140.
- [15] EDGAR R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1702-1797.
- [16] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [17] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35: 1547-1549.
- [18] GUINDON S, DUFAYARD J F, LEFORT V, et al. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *Systematic Biology*, 2010, 59(3): 307-321.
- [19] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754-755.
- [20] 胡永春, 杨子, 习靓靓, 等. DNA条形码技术在白云山国家森林公园苔藓植物群落研究中的应用[J]. *河南农业大学学报*, 2020, 54(5): 836-844.
- HU Y C, YANG Z, XI L L, et al. Application of DNA barcoding in bryophytes community study in Baiyun Mountain National Forest Park[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2020, 54(5): 836-844.
- [21] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [22] LEFORT V, LONGUEVILLE J E, GASCUEL O. SMS: Smart Model Selection in PhyML[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(9): 2422-2424.
- [23] YANG Y M, YU G L, CHEN Y X, et al. Four decades of progress in cylindrospermopsin research; The ins and outs of a potent cyanotoxin[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124653.
- [24] JIA N N, YANG Y M, YU G L, et al. Interspecific competition reveals *Raphidiopsis raciborskii* as a more successful invader than *Microcystis aeruginosa*[J]. *Harmful Algae*, 2020, 97: 101858.
- [25] 蒋永光. 产拟柱胞藻毒素蓝藻及其毒素合成基因的分子生态学研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2014.
- JIANG Y G. Molecular ecology of cylindrospermopsin-producing cyanobacteria and their toxin biosynthesis genes[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [26] 侯宝芹, 张秋勉, 胡晓赫, 等. 钱塘江原水藻类情况分析与监测[J]. *城镇供水*, 2018, 6: 56-65.
- HOU B Q, ZHANG Q M, HU X H, et al. Analysis and monitoring of algae in Qiantang River[J]. *City and Town Water Supply*, 2018, 6: 56-65.
- [27] LIU L M, CHEN H H, LIU M, et al. Response of the eukaryotic plankton community to the cyanobacterial biomass cycle over 6 years in two subtropical reservoirs[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13: 2196-2208.
- [28] 郑震. 基于 GLUE 方法的湖库富营养化风险评估[J]. *灌溉排水学报*, 2020, 39(6): 132-137.
- ZHENG Z. Using GLUE to Evaluate Lacustrine Eutrophication[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2020, 39(6): 132-137.

Isolation and characterization of a *Cylindrospermopsis raciborskii* strain from Lake Xianghu, Hangzhou

Chao Aimin¹, Yu Haiyan¹, Xiao Peng², Li Renhui²

(1. Zhejiang Key Laboratory of Ecological and Environmental Monitoring, Forewarning and Quality Control, Zhejiang Environmental Monitoring Center, Hangzhou 310012, China; 2. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: *Cylindrospermopsis* is a filamentous cyanobacterial genus which can fix nitrogen and form water blooms. It has attracted more and more attention due to its ability to produce cylindrospermopsin (CYN) and its strong invasiveness. The frequency and scale of *Cylindrospermopsis* blooms are significantly increasing worldwide. In China, its distribution has also spread from the southeast coastal areas to inland regions, from tropical and subtropical to temperate zones. However, very few CYN producing *Cylindrospermopsis* strains were found in China, and only two strains were so far isolated from Lake Xianghu in Hangzhou in 2012. In this study, a new strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* was successfully isolated from Lake Xianghu in September 2020. Morphological observation showed that it had a typical morphology within *Cylindrospermopsis raciborskii*. The 16S rRNA gene sequence of this strain was identical and three base pairs in difference respectively with the two strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated in 2012. The PCR detection on *cyrA*, *cyrI* and *cyrJ* showed that the strain was also

positive to these three genes. Further chemical analysis by HPLC showed that the strain was capable of producing CYN toxin with a yield of 1 258.6 $\mu\text{g/g}$. This study increased the number of toxic *Cylindrospermopsis* strains in China, and also showed the adaptation and stability of *Cylindrospermopsis* species to a certain extent. The detection of CYN producing cyanobacteria, combining DNA detection and chemical detection by HPLC, has been applied again in this study. The methods and results of this study can suggest that Lake Xianghu, as an important drinking water source in Hangzhou, should introduce the detection of *Cylindrospermopsis* and CYN in water environmental and ecological monitoring in the future. The present study provides an important scientific basis and technical support for the monitoring of *Cylindrospermopsis* and its toxins.

Keywords: *Cylindrospermopsis raciborskii*; morphological characteristics; cylindrospermopsin; Cyr; cyanobacterial bloom; Lake Xianghu

[责任编辑 刘洋 杨浦]

(上接第 105 页)

The biological function and clinical application of miRNA derived from extracellular vesicles

Yu Guoying, Han Zongyuan, Wang Qiwen

(State Key Laboratory Cell Differentiation and Regulation; Henan International Joint Laboratory of Pulmonary Fibrosis; Institute of Biomedical Science; Henan Center for Outstanding Overseas Scientists of Pulmonary Fibrosis; College of Life Sciences; Overseas Expertise Introduction Center for Discipline Innovation of Pulmonary Fibrosis, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Recently, accumulative attention has been paid to extracellular vesicles (EVs), membrane-enclosed particles, which can be divided into three categories: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Functionally, EVs can convey nucleic acids (DNA, mRNA and noncoding RNAs), proteins and etc. between cells and tissues. microRNAs (miRNAs), as critically and post-transcriptionally regulating gene expression, have also been found in EVs. Recent evidence has indicated that EVs-derived miRNAs (EVs miRNAs) are critically involved in maintaining normal homeostasis. Herein, we review the physiological functions of EVs miRNAs, and discuss their possible application in the diagnosis and treatment of diverse diseases.

Keywords: extracellular vesicles; miRNAs; biological function; diagnosis; therapy

[责任编辑 刘洋 杨浦]