

微生物学报

Acta Microbiologica Sinica

ISSN 0001-6209, CN 11-1995/Q

《微生物学报》网络首发论文

题目： 钝顶螺旋藻低中温适应型新品系的选育及 RAPD 分析
作者： 卢奇奇, 汪凡越, 汪志平, 边永亮, 刘懋昕
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220939
收稿日期: 2022-12-27
网络首发日期: 2023-09-08
引用格式: 卢奇奇, 汪凡越, 汪志平, 边永亮, 刘懋昕. 钝顶螺旋藻低中温适应型新品系的选育及 RAPD 分析[J/OL]. 微生物学报. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20220939>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220939

(研究报告)

钝顶螺旋藻低中温适应型新品系的选育及 RAPD 分析

卢奇奇¹, 汪凡越², 汪志平^{1*}, 边永亮¹, 刘懋昕¹

¹ 浙江大学原子核农业科学研究所, 农业农村部核农学重点开放实验室, 浙江 杭州 310058

² 悉尼大学生命与环境科学学院, 澳大利亚 新南威尔士州 2006 悉尼

摘要: [目的] 选育低中温适应型螺旋藻新品系, 显著拓展螺旋藻工厂化培植的地理范围及时间, 提高产量、降低成本。[方法] 以用于工厂化培植的钝顶螺旋藻 ZJU0116 为出发品系, 用组织匀浆和离心分离法制得其单细胞或原生质球, 先以 0.6% EMS 处理 30 min 再用 2.4 kGy 的 ⁶⁰Co γ 射线辐照, 经低温逆境筛选、5 次冷/热 (12 °C/38 °C) 骤变交替处理、藻丝单体的分离培养、温度适应面构建、蛋白质含量等检测及生产培植试验。[结果] 获得了 1 株蛋白质含量与 ZJU0116 的相当, 而温度适应面和平均日产量依次提高 10.7% 和 10.9% 的低中温适应型突变体, 命名为 ZJU0116(LMTA)。光学显微形态与 RAPD 分析结果显示, 与其亲本 ZJU0116 相比, ZJU0116(LMTA) 藻丝的螺旋数和长度依次减少 54.4% 和 42.1%, 螺距增加 28.8%; 基因组 DNA 在随机引物 S30 的扩增产物中多了 1 条约 470 bp 的条带。[结论] ZJU0116(LMTA) 在工厂化培植中温度适应性好、生产性状稳定, 干藻粉产量可增加 10% 以上, 可为当前螺旋藻产业深度融合“双碳”目标、迈向高质量发展新阶段, 提供必要支撑。
关键词: 钝顶螺旋藻, 工厂化培植, 低中温温度适应性, 突变体, 育种, 随机扩增多态性 DNA

Breeding and RAPD analysis of a new *Spirulina platensis* strain with low-medium temperature adaptability

LU Qiqi¹, WANG Fanyue², WANG Zhiping^{1*}, BIAN Yongliang¹, LIU Maoxin¹

¹ Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

² School of Life and Environmental Sciences, University of Sydney, Sydney 2006, NSW, Australia

资助项目: 国家自然科学基金(30771669, 10975118); 中央高校基本科研业务费专项 (K20220184)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771669, 10975118) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (K20220184)

*Corresponding author. E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

Received: 2022-12-27; Accepted: 2023-04-19

Abstract: [Objective] To breed new *Spirulina* strains with low-medium temperature adaptability for expanding the geographical scope and time, increasing the yield, and reducing the cost of *Spirulina* cultivation. [Methods] The single cells or spheroplasts of *Spirulina platensis* ZJU0116 in large-scale cultivation were prepared by tissue homogenization and centrifugation. They were treated with 0.6% ethyl methane sulfonate for 30 min and 2.4 kGy ⁶⁰Co gamma ray, and then screened by low-temperature stress with 5 times of cold (12 °C)/hot (38 °C) abrupt alternation. The single filaments were cultured separately for the establishment of temperature adaptation surface, determination of protein content, and test of large-scale cultivation. [Results] We obtained a low-medium temperature adaptive mutant, which was named ZJU0116(LMTA), with the protein content equivalent to that of ZJU0116 and the temperature adaptation surface and average daily yield increased by 10.7% and 10.9%, respectively. ZJU0116(LMTA) had the helix number 54.4% lower, the filament length 42.1% lower, and the pitch 28.8% higher than its parent ZJU0116. Moreover, the randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis indicated that the amplification with the random primer S30 for ZJU0116(LMTA) produced an additional band at 470 bp, which revealed significant polymorphisms between ZJU0116(LMTA) and ZJU0116. [Conclusion] ZJU0116(LMTA) has good thermal adaptability and stable production, with a 10% increase in the dry algae powder output in large-scale cultivation. The new strain will promote the development of *Spirulina* industry towards a new stage of deep integration of the "dual carbon" goal and high-quality upgradation.

Keywords: *Spirulina platensis*, large-scale cultivation, low-medium temperature adaptability, mutant, breeding, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

螺旋藻 (*Spirulina*) 又称节螺旋藻 (*Arthrospira*), 是一种原核丝状不分支的光合放氧蓝藻。螺旋藻是目前全球研究及培植生产与开发应用规模最大的经济微藻, 我国螺旋藻粉产量约占世界总量的 50%, 已成为内蒙、云南、江西、江苏等地的支柱产业^[1-4]。目前国内用于工厂化培植的钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 或极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*) 均为喜高温 (33-38 °C)、藻丝长度 $\geq 300 \mu\text{m}$ 、蛋白质含量 $\geq 55\%$ 的品系, 不适宜我国等绝大多数地区秋后至春前气温偏低季节培植生产^[1-5]。为拓展螺旋藻培植的地理范围及时间, 以提高生产场地和设备等资源的利用率, 实现更低成本的高产优质高效生产, 近 30 多年来国内外在选育中低温适应型品系方面作了大量探索^[4,6-9]。张学成等^[6]利用甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理钝顶螺旋藻藻丝, 获得了能在 15 °C 较好生长的耐低温突变体 cc-28 和 cc-30。殷春涛等^[7]利用亚硝基胍 (NTG) 处理钝顶螺旋藻单细胞, 筛选出最适生长温度为 25 °C 的突变品系 Sp-ALT。王妮等^[8]利用 UV 照射螺旋藻单细胞悬液, 获得了最适生长温度依次为 33 和 25 °C 的耐低温突变藻株 ZW1 和 ZW2。关剑^[9]利用 EMS 处理螺旋藻藻丝, 获得了 5 株耐低温突变体 GMPA1、GMPA7、GMPB1、GMPC1、GMPC3。然而, 这些通过诱变获得的耐低温或中温适应型突变体, 因藻丝太短不适于工厂化生产中过滤采收等不足, 而没能应用于螺旋藻工厂化培植生产^[6-9]。如突变体 cc-28、cc-30、Sp-ALT、GMPA1、GMPA7 藻丝的长度依次只

有 172.99 ± 26.61 、 171.51 ± 30.63 、 $35-54$ 、 137 ± 46.8 、 $266 \pm 73.1 \mu\text{m}$ ，均未能达到螺旋藻生产用种藻丝长度需 $\geq 300 \mu\text{m}$ 的下限^[6-9]。本文报道了 1 株利用诱变技术育成、最适生长温度为 27°C 、藻丝长度约 $500 \mu\text{m}$ 、产量提高 10.9%，且已成功应用于工厂化生产的低中温适应型钝顶螺旋藻新品系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

钝顶螺旋藻品系 ZJU0116 由本研究团队选育，工厂化生产性状优良。

1.2 培养与生产条件

采用 Zarrouk's 培养液培养^[10]。实验室培养在智能光温自控培养箱中进行，以日光灯为光源，光通量为 $54 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ，光/暗时间为 12/12 h，光/暗温度 $28/20^\circ\text{C}$ ；在作不同温度培植试验时，温度设为定值，光通量和光照时间不变；规模化培植生产试验在浙江省建德市微藻试验基地进行，培植池建于钢架塑料薄膜温室内、长 $50.7 \text{ m} \times$ 宽 7.5 m ，藻液的平均深度 30 cm 、流速 $5 \text{ m}/\text{min}$ 。实验室和工厂化培植试验，每组均设 3 个重复^[11]。

1.3 诱变处理及突变体筛选

参照汪志平等^[12]、崔海瑞等^[13]的方法，取处于对数生长期、光密度值 OD_{560} 为 0.6 左右的 ZJU0116 藻液 2 mL ，用玻璃组织匀浆器制备成单细胞或原生质球，先用 0.6% 的 EMS 处理 30 min，再置于 ^{60}Co γ 射线辐照场中照射 2.4 kGy ，剂量率为 $15 \text{ Gy}/\text{min}$ ，转入盛有 8 mL Zarrouk's 培养液的 50 mL 三角瓶中于 28°C 培养 3 d；将藻液按 $150 \mu\text{L}/\text{份}$ 分装到 $200 \mu\text{L}$ 的 PCR 管中，在具管内温控功能的 Thermal Cycler PCR 仪 (Hybriid Express, UK) 上以 12°C 1 min、 38°C 1 min 循环 30 次后，置于 12°C 下光照培养，且每隔 6 h 重复一次在 PCR 仪上的冷/热骤变交替处理，共处理 5 次；在藻液见绿的 PCR 管中，用毛细显微分离法^[14]挑取形态均匀、上浮性好、长度 $\geq 300 \mu\text{m}$ 或形态明显发生变异的藻丝单体，分别置于盛有 0.5 mL Zarrouk's 培养液的 1.5 mL EP 管中培养；待藻液见绿后，转入盛有 20 mL Zarrouk's 培养液的 100 mL 三角瓶中培养，并逐级加培养液扩大培养成 250 mL 、 OD_{560} 达 1.0 的藻丝群体；从中选取上浮性和分散性好、生长旺盛、形态均匀的，作为低中温适应型钝顶螺旋藻的候选突变体。

1.4 生物量及蛋白质含量测定

参照文献^[15]，利用 Ultrospec 2000 紫外-可见分光光度仪 (瑞典) 测定藻液在 560 nm 处的光密度值 OD_{560} ，反映生物量。用凯氏定氮法 (GB/T 6432-1994) 测定蛋白质含量。

1.5 显微形态及 RAPD 分析

参照李晋楠等^[16]和 Wang ZP 等^[17]的方法，藻丝形态学分析在 OLYMPUS BX53 光学显微镜 (日本) 上进行，RAPD 分析在 MGL96G 梯度 PCR 仪 (日本) 上进行，31 条随机引物 (S7、S11、S14、S8、S24、S25、S28、S29、S30、S31、S33、S38、S40、S53、S58、S59、S64、S65、S66、S67、S69、S73、S78、S80、S82、S83、S88、S90、S99、S112、S119) 为

上海生工 Sangon (Canada) 产品。

1.6 数据统计与分析

采用SPSS 11.0进行数据统计与分析。利用Excel 2013结合分段插值法估算温度适应曲线与其两端垂线及横坐标所围合的面积。

2 结果与分析

2.1 低中温适应型螺旋藻候选突变体的创制

将用于工厂化培植的喜高温钝顶螺旋藻 ZJU0116 藻丝 (图 1) 制备成单细胞或原生质球, 经 0.6% 的 EMS 和 2.4 kGy 的 ^{60}Co γ 射线复合诱变处理并培养 3 d 后, 藻液被分装至 60 管 PCR 管中, 在 12 °C 光照培养并兼以冷/热骤变交替处理 5 次; 于第 32–36 d 共有 7 管藻液明显长成蓝绿色, 用毛细吸管显微法从中分离到 266 条形态均匀、上浮性好、长度 $\geq 300 \mu\text{m}$ 或形态明显发生变异的藻丝单体, 其中的 71 条经 77–82 d 逐级扩大培养后, 繁育成 250 mL、 OD_{560} 达 1.0 以上藻丝群体, 并从中选取 3 个上浮性和分散性好、生长旺盛、形态均匀, 长度 $\geq 300 \mu\text{m}$ 或形态变异明显的, 作为低中温适应型钝顶螺旋藻的候选突变体, 记为 M1–3, 它们的显微形态学特征如图 1 和表 1 所示。与亲本 ZJU0116 相比, M1–3 藻丝的螺旋数、藻丝长均明显变小, 螺旋数均不足亲本的一半, 藻丝长依次只有亲本的 57.9%、36.2%、8.2%; M1 藻丝的宽度变化不显著, 但 M2 和 M3 的均显著变大; M2 藻丝的螺距变化不显著, 但 M1 和 M3 的依次显著变大和变小。M1–3 三者间, M1 的螺旋数与 M2 和 M3 的呈显著差异; M3 藻丝长度显著变短, 且呈紧密的螺旋形, 其长度分别只有 M1 和 M2 的 14.1% 和 22.7%, 螺距分别只有 M1 和 M2 的 19.1% 和 25.8%; M2 和 M3 藻丝的宽度差异不显著, 但它们与 M1 的呈显著差异。

螺旋藻靠细胞分裂增加藻丝长度, 通过形成藻殖段进行无性繁殖^[4–5]。上述候选突变体 M1–3, 均由其亲本 ZJU0116 的单细胞或原生质球(图 1 S)经理化因子复合诱变后, 长成的藻丝单体繁殖而来, 并经 1 年多、30 多次转接传代的藻丝群体, 它们各自的显微形态学特征一致且稳定。与其他生物一样, 形态学特征也是螺旋藻分类与种质鉴定最基本的依据^[4–5, 15–19]。从上述候选突变体 M1–3 的形态学特征, 相对其亲本 ZJU0116 发生了显著变化且能稳定生长繁衍的事实推测, M1–3 很可能是在遗传水平上发生变异的突变体。

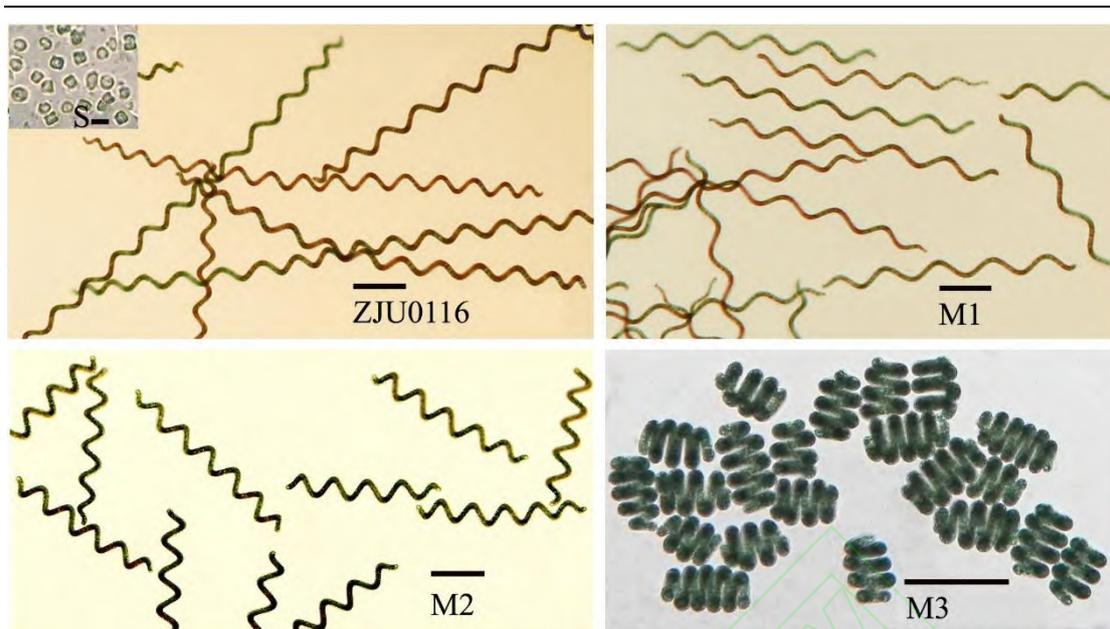


图 1 亲本 ZJU0116 及其单细胞或原生质球 S、候选突变体 M1-3 的光学显微形态

Figure 1. The optic micromorphology of parent ZJU0116 and its single cells or spheroplasts S and candidate mutants M1-3. ZJU0116 and M1-3: Bar=100 μm ; S: Bar=10 μm .

表 1 候选突变体 M1-3 及其亲本 ZJU0116 的形态学参数

Table 1 The morphological parameters of candidate mutants M1-3 and its parent ZJU0116

Strains	Helix number	Filament length (μm)	Filament width (μm)	Pitch (μm)
ZJU0116	13.6 \pm 0.7 A	875.8 \pm 47.6 A	27.2 \pm 1.6 B	65.3 \pm 2.9 B
M1	6.2 \pm 0.6 B	507.5 \pm 38.7 B	26.6 \pm 0.8 B	84.1 \pm 6.4 A
M2	5.0 \pm 0.3 C	316.9 \pm 22.5 C	33.1 \pm 1.2 A	62.4 \pm 5.2 B
M3	4.5 \pm 0.5 C	71.8 \pm 7.3 D	32.8 \pm 0.5 A	16.1 \pm 1.0 C

*: The data is average of 100 replicates. In the same column, values with different capital letters mean significant difference at 0.05 level.

2.2 低中温适应型螺旋藻候选突变体对温度的适应性比较

为考察上述低中温适应型螺旋藻候选突变体 M1-3 对温度的适应性,测定了 M1-3 及其亲本 ZJU0116 在 12-42 $^{\circ}\text{C}$ 下的生长速率。由图 2 所示,相对于最适生长温度为 33 $^{\circ}\text{C}$ 的喜高温品系 ZJU0116, M1-3 的温度适应曲线均明显移向低中温区 (12-33 $^{\circ}\text{C}$), 最适生长温度依次为 27、24.5、25 $^{\circ}\text{C}$ 。M1-3 在 12 $^{\circ}\text{C}$ 时的生长速率依次比 ZJU0116 的提升了 95.2%、109.5%、142.9%; 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 时, M1 和 M2 的生长速率依次比 ZJU0116 的下降了 25.9%和 32.8%, M3 的生长速率比 ZJU0116 的提升了 8.6%。在以 M2 与 ZJU0116 温度适应曲线的交汇点 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 为界的中低温区, M2 的生长速率明显比 ZJU0116 的高, 而在中高温区则相反; 在以 M1 和 M3 与 ZJU0116 温度适应曲线的交汇点 31 $^{\circ}\text{C}$ 为界的中低温区, M1 和 M3 的生长速率均明显比 ZJU0116 的高, 而在高温区, 除 M3 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 附近稍显例外, 总体上也与中低温区的相反。为进一步表征 M1-3 对温度的适应特性, 利用 Excel 并结合分段插值法估算 M1-3 及其亲本

ZJU0116 在 12–42 °C 的生长曲线与其两端垂线及横坐标所围合的面积，即求得温度适应面。与 ZJU0116 相比，M1 和 M3 的温度适应面提高了 10.7% 和 32.3%，而 M2 的则下降了 17.8%。若以 ZJU0116 的最适生长温度 33 °C 为界，将 ZJU0116 及其突变体 M1–3 的温度适应面纵向分开，则它们在中低温区和高温区的适应面的比值依次为 1.71、2.57、3.23、2.51，说明 M1–3 对中低温的适应生长能力比 ZJU0116 的显著提高。

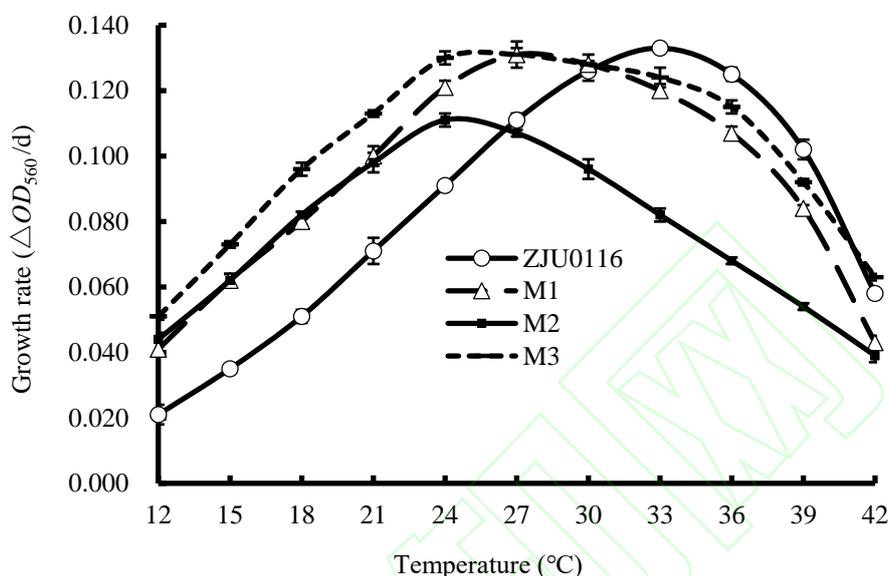


图 2 候选突变体 M1–3 及其亲本 ZJU0116 在不同温度下的生长曲线

Figure 2 Growth curve of candidate mutants M1–3 and its parent ZJU0116 at different temperature. Error bars in figure represent standard deviation.

上述 M1–3 的最适生长温度明显移向中低温区、在中低温区的生长速率和适应面显著提升等事实，充分说明这 3 株候选突变体确具有适应在中低温生长的特性。然而，M3 虽是 3 株候选突变体低中温度适应面最大的，但因其藻丝的长度不足 100 μm，而不能应用于工厂化培植生产，又因 M2 的温度适应面仅为 ZJU0116 的 90.9%，并考虑到螺旋藻工厂化培植过程中藻液温度随气候多变等实际情况^[1,4-5,11]，也不宜应用于工厂化培植生产。M1 不仅藻丝长度符合螺旋藻工厂化生产过滤采收的要求，而且温度适应面还比 ZJU0116 的高出 10.7%，因而选 M1 为低中温适应型螺旋藻候选品系并记之为 ZJU0116(LMTA)，以进一步做工厂化培植试验及分子鉴定。

2.3 低中温适应型螺旋藻候选品系 ZJU0116(LMTA)的工厂化培植试验

为进一步考察低中温适应型螺旋藻候选品系 ZJU0116(LMTA)的温度适应性、产量和遗传稳定性等生产性状，于 2020 和 2021 年的 4–12 月对 ZJU0116(LMTA)及其亲本 ZJU0116 分别作了共 18 个月的工厂化培植试验，经过滤采收和喷雾干燥获得干藻粉，将每月获得的干藻粉合并混匀，称其质量再换算成单位培植面积的日产量，并取样测得蛋白质含量。由表

表 2 ZJU0116(LMTA)及其亲本在工厂化培植中干藻粉的产量及蛋白质含量

Table 2 Yield and protein content of dry algae powder from ZJU0116 (LMTA) and its parents in large-scale

Harvest month	Monthly average temperature (°C)		Yield (g/m ² ·d)		Protein content (%)	
	day	night	cultivation		ZJU0116(LMTA)	ZJU0116
			ZJU0116(LMTA)	ZJU0116		
2020-04	22.1±4.3 c	10.5±2.4 d	5.1±0.5 C	4.3±0.4 C	61.3±0.7 A	62.4±0.8 A
2020-05	28.1±3.4 b	18.6±1.6 c	5.8±0.4 B	4.6±0.4 C	60.6±0.8 A	61.7±0.6 A
2020-06	30.3±3.3 b	23.2±2.1 c	6.7±0.3 A	6.7±0.4 A	61.2±0.4 A	60.8±0.5 A
2020-07	30.8±3.2 b	23.8±1.6 c	6.3±0.4 B	6.8±0.4 A	58.4±0.5 A	57.6±0.4 B
2020-08	35.4±2.3 a	25.6±1.3 b	6.2±0.3 B	6.7±0.5 A	58.9±0.4 A	58.5±0.6 A
2020-09	27.1±5.5 b	19.3±2.7 c	6.7±0.4 A	6.4±0.6 AB	58.6±0.6 A	58.4±0.5 A
2020-10	22.4±2.8 c	13.6±2.6 c	6.6±0.5 A	5.1±0.4 C	60.4±0.7 A	59.7±0.6 A
2020-11	18.5±5.6 c	10.2±2.9 d	5.8±0.4 B	4.4±0.4 C	61.9±0.4 A	59.1±0.4 A
2020-12	10.7±3.7 d	3.3±3.6 d	5.3±0.3 C	4.1±0.3 C	61.2±0.6 A	60.6±0.7 A
2021-04	21.2±4.3 c	12.9±3.0 c	5.2±0.4 C	4.3±0.3 C	62.6±0.8 A	60.7±0.6 A
2021-05	27.1±4.0 b	18.5±2.4 c	5.8±0.4 B	4.6±0.3 C	59.4±0.3 A	58.9±0.5 A
2021-06	29.8±3.5 b	22.0±2.1 c	6.8±0.5 A	6.5±0.3 AB	60.6±0.6 A	61.5±0.7 A
2021-07	32.5±3.5 b	24.7±1.5 c	6.2±0.5 B	6.6±0.5 A	61.2±0.7 A	60.6±0.7 A
2021-08	32.2±2.6 b	23.7±1.3 c	6.1±0.3 B	6.7±0.3 A	59.4±0.6 A	59.6±0.4 A
2021-09	32.3±2.8 b	21.8±1.9 c	6.8±0.5 A	6.4±0.5 AB	61.1±0.5 A	60.3±0.6 A
2021-10	24.9±7.0 c	15.5±4.6 c	6.6±0.4 A	5.0±0.5 C	62.3±0.5 A	58.4±0.8 A
2021-11	17.8±2.9 c	8.5±4.2 d	6.2±0.6 B	4.6±0.5 C	62.4±0.6 A	59.8±0.6 A
2021-12	13.8±4.4 c	3.7±3.3 d	5.2±0.3 C	4.3±0.3 C	61.8±0.7 A	61.4±0.6 A
average	25.4	16.7	6.1	5.5	60.7	60.0

* : The lowercase letters a, b, c and d indicate the monthly average temperature tm: 33 °C<tm≤42 °C, 25 °C<tm≤33 °C, 12 °C<tm≤25 °C and 12 °C>tm>42 °C, respectively; In the same column, different capital letters indicate significant differences at 0.05 level.

2 可知, 培植试验基地浙江省建德市 2020 和 2021 年 4-12 月的对应月平均气温及变化情况基本相近; 6-9 月的月平均气温明显比 4、5 和 10-12 月的高; 各月的日、夜平均气温差异显著; 从日间月平均气温看, 2 年共 18 个月的培植试验中, 仅 2020 年 8 月达螺旋藻生长的高温区(33 °C<tm≤42 °C), 2020 年 12 月处于螺旋藻的不适或停止生长区(12 °C>tm>42 °C), 有 9 个月处于螺旋藻生长的中温区(25 °C<tm≤33 °C), 7 个月处于螺旋藻生长的低温区(12 °C≤tm≤25 °C)。ZJU0116(LMTA)及其亲本 ZJU0116 各 18 批螺旋藻干粉的蛋白质含量, 几乎不随季节性气温等变化而明显波动, 且均在 60%左右, 显著高于食用螺旋藻粉国家标准

(GB/T16919-1997) 中蛋白质含量 $\geq 55\%$ 的要求。ZJU0116(LMTA)和 ZJU0116 的日产量随季节性气温等变化均呈现明显波动,但从总体上看,ZJU0116(LMTA)的波动幅度和频次都比 ZJU0116 的小,ZJU0116(LMTA)的平均日产量也比 ZJU0116 的提高了 10.9%。ZJU0116 日产量的峰值出现在每年气温最高 7 和 8 月份,而 ZJU0116(LMTA)日产量的峰值则出现在每年气温次高的 6、9 和 10 月份,这与 ZJU0116 和 ZJU0116(LMTA)的最适生长温度依次为 33 和 27 °C 高度吻合。上述结果进一步说明,ZJU0116(LMTA)对温度的适应性总体上比 ZJU0116 的好,也更能适应当前光、温随季节和气候变化的工厂化培植模式。2022 年,ZJU0116(LMTA)在浙江、江西等地所作的 150 多亩培植生产结果(未列出)显示,其形态、适应性、生化组成等生产性状均保持稳定,并使干藻粉的产量普遍提高 10% 以上。因此,进一步加大 ZJU0116(LMTA)推广应用,有助于切实推进当前螺旋藻产业深度融合“双碳”目标、迈向高质量发展的新阶段。

2.4 ZJU0116(LMTA)的 RAPD 分析

以 ZJU0116(LMTA)及其亲本 ZJU0116 的基因组 DNA 为模板,S7 等 31 条对螺旋藻 DNA 作 PCR 具清晰电泳条带的 10-mer 寡核苷酸为随机引物,进行 RAPD (Randomly Amplified

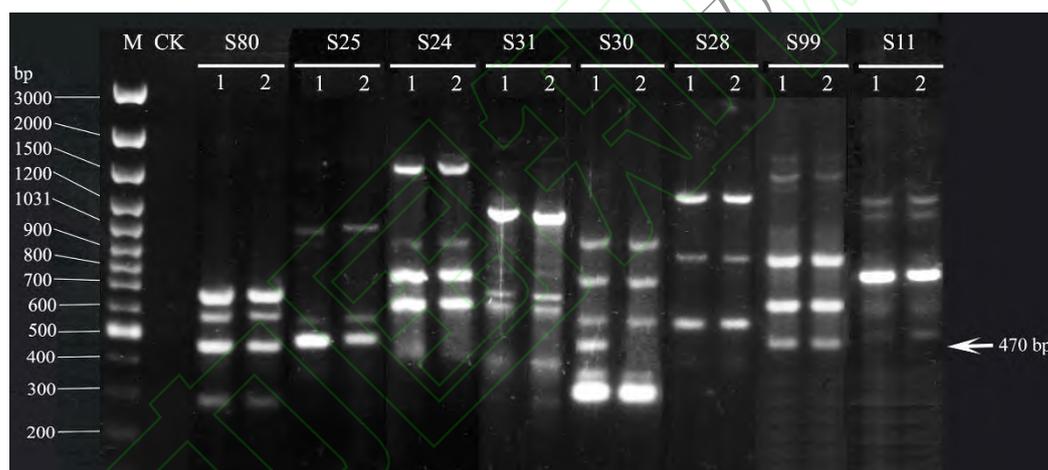


图3 ZJU0116(LMTA)及其亲本ZJU0116的RAPD电泳图谱

Figure 3 RAPD electrophoresis map of ZJU0116(LMTA) and its parent ZJU0116. M: DNA marker; 1: ZJU0116(LMTA); 2: ZJU0116; CK: control; Arrow: difference bands.

Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 分析,以检测 ZJU0116(LMTA)与 ZJU0116 在分子遗传水平的差异性。如图 3 所示,除 S30 扩增产物的电泳图谱中 ZJU0116(LMTA)比 ZJU0116 的多了 1 条约 470 bp 的条带,S80、S25、S24、S31、S28、S99 和 S11 等其他 30 条引物对 ZJU0116(LMTA)和 ZJU0116 扩增的电泳条带均相同。这表明 ZJU0116(LMTA)确实是 1 株因 ZJU0116 经物理化学复合诱变,在分子遗传水平发生变异,进而引发形态、生理生态水平发生变异的突变体。

3 讨论

选择适宜的诱变材料和诱变因子及其剂量是诱变育种成败的关键^[6-9, 11-13]。国内外已有

众多研究与实践表明,螺旋藻作为地球最古老的光合放氧生物之一,具有超强抗电离辐射的能力,其藻丝对⁶⁰Co γ射线的致死剂量≥6.4 kGy,而制备成单细胞或原生质球后,对⁶⁰Co γ射线的抗性即丧失近半,这与螺旋藻藻丝外鞘套及细胞壁上具辐射保护作用的多糖被去除密切相关^[4, 12, 15]。同时,螺旋藻对由物理、化学、生物等因子引发的DNA损伤,还具有超强的修复功能,这主要源于螺旋藻基因组上存有大量的重复序列及强大的核酸酶系统^[20-21]。基于螺旋藻的上述生理生化与分子遗传学特性,本研究利用化学因子EMS和物理因子γ射线复合诱变处理螺旋藻单细胞或原生质球,比用单一的EMS和NTG等化学因子及γ射线、Uv等物理因子处理螺旋藻藻丝或单细胞的诱变效果好^[6-9]。这一方面是因不同性质诱变因子的相互配合,不仅可减缓损伤,还可提高突变频率;另一方面是因游离的单细胞或原生质球一旦发生突变,比串连在藻丝上的突变细胞,更易分离出来^[4, 11]。

目标突变体的筛选方法是诱变育种成败的另一关键^[6-9, 11-13]。已有筛选螺旋藻等温度适应型品种(系),均将诱变处理后的材料置于低温或高温等相应逆境下进行筛选^[6-9]。这种方法虽也可行,但会因诱变体系中含众多在设定逆境下仍能生存甚至缓慢生长的亲本或非目标突变体,而严重影响筛选效率^[6-9]。为此,本研究在采用低温逆境筛选低中温适应型螺旋藻品系的同时,还在前期多次预试验的基础上,增加了5次冷/热(12℃/38℃)骤变交替处理,使诱变体系中对温度响应慢的细胞或原生质球因受应激而损伤甚至解体,从而将能对温度快速响应的突变体筛选出来。Dong SR等^[3]研究表明,将螺旋藻从35℃移至15℃再迅速移回到35℃,会导致1294个基因异常表达,说明短时间冷、热处理对螺旋藻的生理代谢甚至生存都有严重影响。笔者在试验中也发现,ZJU0116的单细胞或原生质球经5次冷/热骤变交替处理,藻液中会出现蓝色的藻蓝蛋白等水溶性色素,说明部分细胞或原生质球破裂。PCR仪在0-100℃范围内,最大升降温速度可达5℃/s,且精度可达±0.2℃,因而能很好满足本研究对诱变后的材料作冷/热骤变交替处理的工艺要求。特别是本研究选用的具管内温控功能的Thermal Cycler PCR仪(Hybrid Express, UK),能直接测控PCR管内介质的温度,就更加精准。需要进一步提醒的是,某些PCR仪适用体积为200和500μL的两种PCR管,在对诱变体系作冷/热骤变交替处理时,尽量选用200μL的PCR管,以使PCR管中介质的热容量尽可能少,冷/热骤变交替处理的效果更佳。

因目前国内外工厂化生产螺旋藻,普遍采用的是带藻液环流装置、露天或盖有塑料薄膜/玻璃、面积300-700m²的跑道式培植池^[4-5, 11]。这种模式的培植温度和光照随季节和气候变化大,因而选育光温适应性好的品系,是实现螺旋藻低成本高产优质高效生产的重要前提。本研究建立的温度适应面评价螺旋藻品系生产性状的方法,比之前采用在某一低温度下测定生长量或光合放氧活性等评价方法,更合乎当前工厂化培植模式的生产良种选育实践。如本研究中,候选突变体M2的中低温生长特性也是好的,藻丝长也符合工厂化生产过滤采收的要求,但因它的温度适应面比其亲本ZJU0116及另2个突变体的显著偏低,而未能选入生产良种。

RAPD技术是一种高通量检测基因组DNA多态性简便且灵敏的方法,随着实验条件与

操作技术的不断改进,起初 RAPD 结果的重复性较差、可能会出现假阳性条带等不足,也得到了圆满解决^[16]。RAPD 技术自 1990 年发明以来,已广泛应用于包括螺旋藻在内众多生物分子标记、种质鉴定及分类学等研究^[11, 16-17, 22]。本研究应用 S7 等 31 条有效引物对低中温适应型螺旋藻候选品系 ZJU0116(LMTA)及其亲本 ZJU0116 的基因组 DNA 进行扩增,仅 S30 的扩增产物显现显著的多态性差异(图 3),从而表明 ZJU0116(LMTA)与 ZJU0116 的分子遗传背景既高度统一性,又确因发生突变而有显著差异。目前我们正以上述 RAPD 差异条带为切入点,并融合螺旋藻全基因组序列等研究成果^[20-21],开展 ZJU0116(LMTA)突变位点及优良温度适应机制等研究。

4 结论

本文针对国内外螺旋藻产业需求,在构建低温逆境筛选±冷/热骤变交替处理及温度适应面评价等方法的基础上,利用化学和物理因子复合诱变处理螺旋藻单细胞或原生质球,育成了 1 株最适生长温度为 27 °C、藻丝长度约 500 μm、温度适应面和平均日产量依次提高 10.7% 和 10.9%,且已成功应用于工厂化生产的低中温适应型钝顶螺旋藻新品系 ZJU0116(LMTA)。ZJU0116(LMTA)对切实推进当前螺旋藻产业种质更新、提质降本增效,具有重要意义;所建的技术与评价方法为其他经济生物温度适应型新品种(系)选育,提供了有意借鉴。

参考文献:

- [1] NGUYEN DB, DOAN TTY, PHI TCM, NGO TA, DIEU HUONG VU L, DANG DK. *Arthrospira* production in Vietnam: current status and prospects[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2021, 15: 100803.
- [2] CHEN J, WANG Y, BENEMANN JR, ZHANG XC, HU HJ, QIN S. Microalgal industry in China: challenges and prospects[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 715-725.
- [3] DONG SR, JIANG YY, BU YY, WANG SY, ZHANG HY, WANG RB. Growth, photosynthetic pigment proteins responses and transcriptome analysis provide insights into survival strategies against short-term cold stress in the blue-green algae, *Arthrospira*[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 27: 101403.
- [4] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
HU HJ. Principles of biology and biotechnology of *Spirulina*[M]. Beijing: Science Press, 2003 (in Chinese).
- [5] 吴开国. 螺旋藻保健食品新资源和开发应用[M]. 海口: 南海出版公司, 1998.
- [6] 张学成, 谭桂英, 何丽容, 党宏月. 甲基磺酸乙酯对螺旋藻的诱变作用[J]. *海洋学报*, 1990, 12(4): 517-522, 539.

ZHANG XC, TAN GY, HE LR, DANG HY. Mutagenic effect of ethyl methylsulfonate on *Spirulina platensis*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 1990, 12(4): 517–522, 539 (in Chinese).

[7] 殷春涛, 胡鸿钧, 李夜光, 龚小敏, 施定基. 中温螺旋藻新品系的选育研究[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(3): 250–254, 298.

YIN CT, HU HJ, LI YG, GONG XM, SHI DJ. Studies on middle temperature strains selection of *Spirulina platensis*[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1997, 15(3): 250–254, 298 (in Chinese).

[8] 王妮, 王素英, 师德强. 耐低温螺旋藻新品系的诱变选育[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12552–12553.

WANG N, WANG SY, SHI DQ. Mutant screening of low temperature tolerance strain of *Spirulina*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(29): 12552–12553 (in Chinese).

[9] 关剑. 耐低温节旋藻新品系的培育[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2017.

GUAN J. The new varieties breeding of low temperature tolerant *Arthrospira*[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2017 (in Chinese)

[10] Zarrouk C. Contribution a l'étude d'une cyanophycee. Influence de divers factures physiques et chimiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* [D]. Thesis, University of Paris, 1966.

[11] 李晨晨, 汪凡越, 汪志平, 卢奇奇, 陈子元. 高沥水性钝顶螺旋藻新品系的选育及超微结构与 RAPD 分析[J]. 微生物学报, 2020, 60(2): 237–245.

LI CC, WANG FY, WANG ZP, LU QQ, CHEN ZY. Selection and ultrastructure and RAPD analysis of a new *Spirulina platensis* strain with high-efficiency dehydration performance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(2): 237–245 (in Chinese).

[12] 汪志平, 叶庆富, 崔海瑞, 徐步进, 吴美文. 超长钝顶螺旋藻的选育及形态和生长特性初步研究[J]. 核农学报, 1998, 12(3): 146–150.

WANG ZP, YE QF, CUI HR, XU BJ, WU MW. Selection of the mutant of *Spirulina platensis* with extra long filaments and morphology and growth of the mutant[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 1998, 12(3): 146–150. (in Chinese)

[13] 崔海瑞, 汪志平, 徐步进. 甲基磺酸乙酯对钝顶螺旋藻生长和形态的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 645–648.

CUI HR, WANG ZP, XU BJ. The effects of ethyl methane sulphonate on the growth and morphology of *Spirulina platensis*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1997, 23(6): 645–648. (in Chinese)

[14] 汪志平, 贾小明, 傅俊杰, 吴玉卫, 陈声明. 不同形态钝顶螺旋藻藻丝体分离和纯化的方法[J]. 浙江农业学报, 1998, 10(5): 275–277.

WANG ZP, JIA XM, FU JJ, WU YW, CHEN SM. The methods of isolation and purification of

different morphological filaments of *Spirulina platensis*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1998, 10(5): 275–277. (in Chinese)

[15]汪志平, 徐步进. 螺旋藻的电离辐射抗性及其与多糖含量的关系[J]. 核农学报, 2001, 15(4): 229–233.

WANG ZP, XU BJ. Characteristic of resistant ionization-radiation and its relationship with polysaccharide contents in *Spirulina*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2001, 15(4): 229–233 (in Chinese).

[16]李晋楠, 汪志平. RAPD 分子标记技术用于螺旋藻(*Spirulina*)分类的研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 203–208.

LI JN, WANG ZP. Classification with RAPD marker in *Spirulina*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(2): 203–208 (in Chinese).

[17] WANG ZP, ZHAO Y. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (cyanophyta): from linear to helical [J]. Journal of Phycology, 2005, 41(3): 622–628.

[18] ZHOU HN, XIE YG, WANG ZP, SHAO B, LIU XY, YU JX, CHEN ZY. Evaluation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* production trait using *cpcHID* operon[J]. Pakistan Journal of Botany, 2013, 45(2): 687–694.

[19] 杨灵勇, 汪志平, 曹学成, 陈晓燕, 徐步进. *cpcHID* 操纵子序列用于钝顶节旋藻品系分类与鉴定的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 1003–1006.

YANG LY, WANG ZP, CAO XC, CHEN XY, XU BJ. *cpcHID* operon as a new tool for classification and identification of *Arthrospira platensis* strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 1003–1006 (in Chinese).

[20] FUJISAWA T, NARIKAWA R, OKAMOTO S, EHIRA S, YOSHIMURA H, SUZUKI I, MASUDA T, MOCHIMARU M, TAKAICHI S, AWAI K, SEKINE M, HORIKAWA H, YASHIRO I, OMATA S, TAKARADA H, KATANO Y, KOSUGI H, TANIKAWA S, OHMORI K, SATO N, IKEUCHI M, FUJITA N, OHMORI M. Genomic structure of an economically important Cyanobacterium, *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* NIES–39[J]. DNA Research, 2010, 17(2): 85–103.

[21] XU T, QIN S, HU YW, SONG ZJ, YING JC, LI PZ, DONG W, ZHAO FQ, YANG HM, BAO QY. Whole genomic DNA sequencing and comparative genomic analysis of *Arthrospira platensis*: high genome plasticity and genetic diversity[J]. DNA Research, 2016, 23(4): 325–338.

[22] HARING MA, SCHURING F, URBANUS J, MUSGRAVE A, van den ENDE H, FERRIS PJ. Random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs) as tools for gene mapping in *Chlamydomonas eugametos* (Chlorophyta)[J]. Journal of Phycology, 1996, 32(6): 1043–1048.