



高沥水性钝顶螺旋藻新品系的选育及超微结构与 RAPD 分析

李晨晨¹, 汪凡越², 汪志平^{1*}, 卢奇奇¹, 陈子元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浙江工业大学环境学院, 浙江 杭州 310014

摘要:【目的】选育高沥水性的螺旋藻新品系, 显著降低藻粉生产中干燥的能耗。【方法】以用于工厂化培植的钝顶螺旋藻 ZJU0115 为出发品系, 用组织匀浆-离心沉降法制得其原生质球, 并先以 0.6% EMS 处理 30 min 再用 2.4 kGy 的 ⁶⁰Co γ 射线辐照, 经含 0.02% 黄原胶(xanthan gum)的 Zarrouk's 培养液筛选、藻丝单体分离培养、藻泥持水率和胞外多糖(EPS)等检测及生产培植试验。【结果】获得了一株产量、蛋白质和多糖含量与 ZJU0115 相当, 而藻泥持水率和 EPS 含量分别下降 5.9% 和 29.7% 的突变体, 命名为 ZJU0115(HD)。超微结构与随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析结果显示, 与其亲本 ZJU0115 相比, ZJU0115(HD)藻丝表面更光滑, 可能为酸性多糖的乳白状粘附物也更少; ZJU0115(HD)细胞内的多磷酸盐颗粒显著变小且呈弥散状; 基因组 DNA 在随机引物 S90 的扩增产物中显示出多态性差异。【结论】ZJU0115(HD)在工厂化培植中生产性状好、高沥水性能稳定, 藻泥的干燥能耗降低了近 50%, 它的育成与应用, 有助于推进当前螺旋藻产业迈向高效、节能、绿色、环保发展的新阶段。

关键词: 钝顶螺旋藻, 高沥水性, 突变体, 育种, 超微结构, 随机扩增多态性 DNA 标记

螺旋藻(*Spirulina*)又称节旋藻(*Arthrospira*), 是一种古老的原核丝状光合放氧蓝藻, 已成为当前全球培植与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一半^[1-4]。目前国内外螺旋藻粉生产普遍采用循环式跑道池培养, 再用孔径约 50 μm 的滤网过滤采收与清洗藻体, 并沥至自然不滴水时, 将藻泥喷雾干燥制得干粉^[4-6]。这一工艺虽成熟且已基本实现自动化, 但因螺旋藻

体的持水力强, 沥至自然不滴水时, 藻泥的含水量仍高达 93%–96%, 即 100 kg 藻泥干燥所得藻粉仅为 4–7 kg, 干燥 1 kg 藻粉至少需消耗 6 元的燃油或天然气^[4-5,7]。如此高的干燥能耗, 不仅极大限制了螺旋藻粉作为优质饲料蛋白源在畜禽和水产养殖等需求量更大领域的大规模应用, 而且一些生产基地为降低干燥成本而擅自燃烧煤炭甚至柴薪, 严重破坏生态、污染环境。为此, 国内外

基金项目: 国家自然科学基金(30771669); 浙江省院士基金(2016J51701)

*通信作者。Tel/Fax: +86-571-86971021; E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2019-03-25; 修回日期: 2019-05-30; 网络出版日期: 2019-11-11

近 20 多年来,一直试图利用连续离心、减压抽滤、吸附交换等脱水工艺,降低螺旋藻藻泥的持水量,但因藻体的持水力强、藻细胞抗机械作用力性能差等原因,而均未能奏效^[4-5,7]。本文报道了 1 株利用诱发突变技术育成、可使藻粉干燥能耗降低近 50%的高沥水性钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)新品系。

1 材料和方法

1.1 供试材料

工厂化生产性状优良的钝顶螺旋藻品系 ZJU0115,保存于浙江大学原子核农业科学研究所生物资源与分子工程实验室。

1.2 方法

1.2.1 培养与生产条件:采用 Zarrouk's 培养液培养^[8]。实验室培养在全自动温控光照培养箱中进行,光照强度为 54 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间为 12 h/d,光照时为 28 $^{\circ}\text{C}$,黑暗时为 20 $^{\circ}\text{C}$;工厂化培养试验在本实验室微藻试验合作基地进行,养殖池呈跑道型,盖有塑料薄膜,面积为 380 m^2 ,藻液的平均深度 30 cm,平均流速 5 m/min。当藻液的 OD_{560} 接近 0.8 时,用孔径约 50 μm 的滤网过滤采收与清洗藻体,并沥至自然不滴水时,将藻泥直接用螺杆泵上样,电动高速离心式喷头雾化,在 EPWG-200 型喷雾干燥器中干燥,进口和出口温度依次为 170 $^{\circ}\text{C}$ 和 80 $^{\circ}\text{C}$ ^[4-5]。

1.2.2 生物量测定:参照文献[9],利用 Ultrospec 2000 紫外-可见分光光度计(瑞典)测定藻液在波长 560 nm 处的光密度值 OD_{560} ,反映生物量。

1.2.3 诱变处理及突变体筛选:诱变处理及突变体筛选参照汪志平等^[10]、崔海瑞等^[11]的方法进行。将 5 mL 处于对数生长期、 OD_{560} 约 0.5 的钝顶螺旋

藻 ZJU0115 藻液中的藻丝,用组织匀浆-离心沉降法制备成原生质球,先以 0.6% EMS 处理 30 min,再用剂量率为 15 Gy/min 的 ^{60}Co γ 射线辐照 160 min 后,转入盛有 50 mL Zarrouk's 培养液的 250 mL 三角瓶中培养;待藻液见绿后,缓慢加入 25 mL 含 0.06% 黄原胶的 Zarrouk's 培养液,充分摇匀后,静置培养 3-5 d;连续光照培养 4 h 后,用吸管轻轻吸取悬浮且分散于液面的藻丝,用毛细吸管显微分离法^[12]挑取螺距和直径均匀、长度 $\geq 300 \mu\text{m}$ 、墨绿、健壮的藻丝单体,分别置于盛有 0.5 mL Zarrouk's 培养液的 1.5 mL Eppendorf 管中培养;待藻液见绿后,转入盛有 20 mL Zarrouk's 培养液的三角瓶中培养,并逐级扩大培养,直至繁育成 250 mL、 $OD_{560} \geq 1.0$ 的藻丝群体;并从中选取生长快、上浮性和分散性好、形态均匀的,作为高沥水性钝顶螺旋藻的候选突变体。

1.2.4 藻体蛋白质和多糖含量测定:蛋白质含量采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-1994);多糖含量测定参照文献[9]测定;胞外粗多糖提取与检测参照尤珊等^[13]的方法进行。

1.2.5 显微形态、超微结构及随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)分析:参照李晋楠等^[14]和 Wang 等^[15]的方法,利用 OLYMPUS BX53 光学显微镜(日本)进行藻丝形态学分析;利用 AMRAY KYKY-1000B 扫描电子显微镜(中国)进行藻丝表观超微结构分析;利用 MGL96G 梯度 PCR 仪(日本)进行 RAPD 分析。所用的 23 条随机引物购自上海生工 Sangon (Canada)生物工程技术服务有限公司,编号依次为 S₂₄、S₃₃、S₃₈、S₄₀、S₅₃、S₅₈、S₅₉、S₆₄、S₆₅、S₆₆、S₆₇、S₆₉、S₇₃、S₇₈、S₈₀、S₈₂、S₈₃、S₈₈、S₉₀、S₉₉、S₁₁₂、S₁₁₈、S₁₁₉。参照郭亚华等^[16]的方法,利用 JEM-1200 EX 透射电子显微镜(日本)进行藻细胞超微结构分析。

1.3 数据处理

采用 SPSS 11.0 对形态学参数、生产性状指标等, 进行数理统计及差异显著性分析。

2 结果和讨论

2.1 高沥水性螺旋藻候选突变体的筛选

将钝顶螺旋藻 ZJU0115 藻丝(图 1)先制备成直径约 $6\ \mu\text{m}$ 、呈球体或椭球体的原生质球(图 1 S), 再经 0.6% 的 EMS 和 2.4 kGy 的 ^{60}Co γ 射线复合诱变处理。培养 30 d 后, 从含 0.02% 黄原胶的藻液中, 分离到 176 条形态均匀、长度 $\geq 300\ \mu\text{m}$ 、墨绿、健壮的藻丝单体, 其中的 103 条经 68–73 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 个生长快、上浮性和分散性好、形态均匀的, 作为高沥水性钝顶螺旋藻的候选突变体, 记为 M1–3, 它们的形态学特征如图 1 和表 1 所示。与亲本 ZJU0115 相比, M1–3 藻丝的螺旋数、藻丝长均明显变小; M1 和 M3 藻丝的螺距分别显著变大和变小, M2 的变化不显

著。同时, M1–3 三者间, 螺距呈显著差异, M1 的是 M3 的近 2.3 倍; M1 的螺旋数与 M2 和 M3 的呈显著差异; M3 的藻丝长与 M1 和 M2 的呈显著差异。

螺旋藻由成熟藻丝形成藻殖段, 进行无性繁殖^[4]。上述候选突变体 M1–3, 均由其亲本 ZJU0115 的原生质球(图 1 S)经化学和物理因子复合诱变后, 长成的藻丝单体繁殖而来, 经 1 年多、30 多次转接传代的藻丝群体, 它们各自的形态学特征一致且稳定, 也未出现嵌合体或回复突变体。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^[4,15,17–18]。从上述候选突变体 M1–3 的形态学特征和相对其亲本 ZJU0115 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。同时, 包括作者在内的众多研究者^[4–5,9,13]在实验室研究与生产实践中均发现, 当螺旋藻生长至 OD_{560} 超过 0.8 时, 藻丝分泌到培养液中的胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)会明显增多。这些分泌物不仅增大了藻液粘稠度, 会使藻体的上浮性能降低

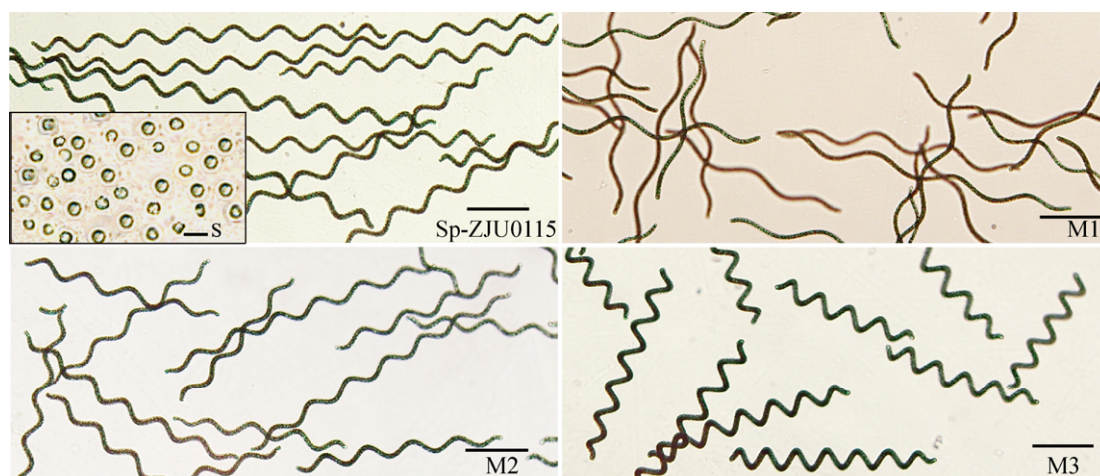


图 1. 亲本 ZJU0115 及其原生质球 S、候选突变体 M1–3 的光学显微形态

Figure 1. The optic micromorphology of parent ZJU0115 and its spheroplasts S and candidate mutants M1–3. ZJU0115 and M1–3: Bar=100 μm ; S: Bar=10 μm .

表 1. 候选突变体 M1-3 及其亲本 ZJU0115 的形态学参数

Table 1. The morphological parameters of candidate mutants M1-3 and its parent ZJU0115

Strains	Helix number	Filament length/ μm	Pitch/ μm
ZJU0115	10.0 \pm 0.8 A	700.7 \pm 81.6 A	72.1 \pm 2.9 A
M1	3.4 \pm 0.5 B	374.8 \pm 51.0 B	122.2 \pm 6.3 B
M2	6.0 \pm 0.8 C	373.1 \pm 57.7 B	70.9 \pm 1.1 A
M3	5.8 \pm 0.8 C	304.6 \pm 43.8 C	54.0 \pm 2.3 C

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

且易于聚结成团,严重影响藻体对光能和营养物质的有效利用,而且还会堵塞滤布的网孔,致使藻体过滤采收困难,并显著增大藻泥的持水量。在实际生产中,基于时效、产量、成本等多重考虑,一般会在藻液 OD_{560} 接近 0.8 时即进行采收^[4-5]。本文在高沥水性候选突变体的筛选体系中加入的黄原胶,是一种由假黄单胞菌属发酵产生的 EPS,具有很好的水溶性及耐酸、碱、盐等特性,在食品、医药等行业广泛用作多种目的的增稠剂、稳定剂和加工辅助剂^[19]。实验表明,在螺旋藻液中加入 0.02% 黄原胶,对藻体上浮性和分散性等方面的影响程度,与藻液 $OD_{560} \approx 1.0$ 时藻体分泌的 EPS 的相当。本文尝试用黄原胶使经诱变处理藻液中粘结性强的藻丝聚结成团、生长受阻,而将粘附性弱、分散性好、能自身趋光浮游至液面的藻丝筛选出来。所选出的 M1-3,当 OD_{560} 超过 1.0 时,

它们的藻丝仍能分散并上浮于液面,与其亲本 ZJU0115 明显不同。因此, M1-3 可望成为具高效沥水性能的钝顶螺旋藻候选突变体。

2.2 高沥水性螺旋藻候选突变体的工厂化培植试验

为进一步考察高沥水性螺旋藻候选突变体 M1-3 的沥水性能、产量和遗传稳定性等生产性状,于 2017 年 5 月-12 月对 M1-3 及其亲本 ZJU0115 作了 8 个月的工厂化培植试验,每月采收 2 次共 16 次,测定每次的干燥 100 kg 藻泥柴油消耗量、干燥 100 kg 藻泥收获干藻粉量、干藻粉产量、干藻粉多糖和蛋白质含量、分泌至藻液的 EPS 含量。由表 2 可知,与 ZJU0115 相比,干燥 100 kg M1-3 藻泥的柴油消耗量均无显著变化,但收获的干藻粉量依次增加了 89.5%、98.2%、73.7%,也即藻泥的持水率依次下降了 5.4%、5.9%、4.4%; M2 的产量略有增加,而 M1 和 M3 依次下降了 21.5% 和 18.5%; M1-3 藻粉的多糖和蛋白质含量均无显著变化,但 EPS 含量则依次下降了 32.4%、29.7% 和 24.3%。

蛋白质含量是螺旋藻、小球藻等微藻产品的重要质量技术指标,一般要求达到干藻重的 50% 以上;螺旋藻多糖是一类能显著提高人及畜禽和水产动物免疫力、抗病力等功效的生物活性物质,其含量一般占干藻重的 4%-9%,也是衡量螺旋藻

表 2. 候选突变体 M1-3 及其亲本 ZJU0115 在工厂化培植中的生产性状

Table 2. Production traits of candidate mutant M1-3 and its parent ZJU0115 in large-scale cultivation

Strains	ZJU0115	M1	M2	M3
Consumption of diesel oil/100 kg <i>Spirulina</i> sludge/L	4.5 \pm 0.3 A	4.7 \pm 0.4 A	4.6 \pm 0.2 A	4.5 \pm 0.4 A
Dried powder/100 kg <i>Spirulina</i> sludge/kg	5.7 \pm 0.4 A	10.8 \pm 0.3 B	11.3 \pm 0.3 B	9.9 \pm 0.2 B
Production of dry algae powder/[g/(m ² ·d)]	6.5 \pm 1.4 A	5.1 \pm 1.6 B	6.7 \pm 1.2 A	5.3 \pm 1.5 B
Polysaccharide content in algae/%	6.4 \pm 1.9 A	6.2 \pm 1.6 A	6.5 \pm 1.2 A	6.9 \pm 2.1 A
Protein content in algae/%	57.2 \pm 3.6 A	56.6 \pm 2.9 A	57.8 \pm 3.2 A	56.7 \pm 2.5 A
Extracellular polysaccharide content/(mg/L)	3.7 \pm 0.6 A	2.5 \pm 0.4 B	2.6 \pm 0.5 B	2.8 \pm 0.8 B

*: The data is average of 16 replicates. In the same line, values with different superscripts mean significant difference at 0.05 level.

粉品质的重要指标^[1,4-5,9]。由表 2 可知, 3 个候选突变体 M1-3 藻体的蛋白质和多糖含量, 均符合螺旋藻产品的基本质量技术指标。值得注意的是, 截止 M1-3 采收时, 分泌到培养液中的 EPS 比 ZJU0115 的下降了 24%–32%。EPS 是螺旋藻培植生产中不能有效采收、增大藻体采收难度和藻泥持水率的副产物, EPS 分泌量的显著下降, 正是 M1-3 藻泥大幅降低持水率的主要原因。M1-3 的藻丝长虽比其亲本 ZJU0115 的短一半左右(表 1), 但均大于生产上普遍要求的下限 300 μm , 因而从产量、蛋白质含量等主要指标看, 它们均可用于工厂化生产。而综合考虑采收效率、产量和干燥成本等因素, 以 M2 为高沥水性的钝顶螺旋藻新品系为最佳, 记之为 ZJU0115(HD)。近 10 多年来, 螺旋藻等经济微藻的生产技术与装备得到了很大发展。如将喷雾干燥器的上样泵由诺莫泵改为螺杆泵, 雾化器喷头由气动式改为电动高速离心式, 使进样藻泥的允许含固量至少提高了 5%, 即含固量高达 15% 的藻泥可直接进样干燥。由表 2 可知, 100 kg 含固量为 11.3% 高沥水性钝顶螺旋藻新品系 ZJU0115(HD) 的藻泥, 直接用螺杆泵上样、电动高速离心式喷头雾化干燥所得干藻粉的量, 是 100 kg 含固量为 5.7% 的亲本 ZJU0115 的 1.98 倍, 而二者的柴油消耗量相当。可见, ZJU0115(HD) 藻粉的干燥能耗仅为 ZJU0115 等普通生产种的一半。2018 年对 ZJU0115(HD) 所作 800 余亩的培植生产结果(未列出)表明, 其形态、产量、适应性、沥水性、生化组成等生产性状均保持稳定。此外, 作者还注意到, 在半连续式生产后期, ZJU0115(HD) 的藻液比 ZJU0115 等普通生产种的更澄清、流动性更好, 且泡沫及杂菌和轮虫等污染生物也更少。这很可能与 ZJU0115(HD) 分泌到培养液中的胞外多糖含量大幅度减少相关。因此,

进一步加大 ZJU0115(HD) 的研究与推广应用, 有助于切实推进当前螺旋藻产业迈向高效、节能、绿色、环保发展的新阶段。

2.3 ZJU0115(HD)的超微结构解析

如图 2-A 所示, 在扫描电子显微镜下, 高沥水性新品系 ZJU0115(HD) 与其亲本 ZJU0115 相比, 藻丝表面更光滑, 且藻丝间隙区几乎没有如箭头所指的乳白状粘附物。在扫描电子显微镜下, 如图 2-B 箭头所指, ZJU0115(HD) 细胞内多磷酸盐颗粒呈弥散状、直径小于 0.12 μm , 而 ZJU0115 中的多磷酸盐颗粒大多聚集成块分布于细胞中央, 直径可达 0.53 μm 。

与大多数蓝藻一样, 螺旋藻细胞外层具鞘(sheath), 其厚薄会因物种、温度等不同而存有差异; 鞘的化学性质至今不甚清楚, 但至少有一部分松懈的包裹物, 可能是酸性多糖^[4,9]。高沥水性新品系 ZJU0115(HD) 藻丝外鞘不如其亲本 ZJU0115 的明显, 且可能为酸性多糖的乳白状粘附物也更少, 有利于减小藻体表面的粘性, 且分泌到藻液中的 EPS 也更少。这一超微结构特征与表 2 中 ZJU0115(HD) 的持水率、EPS 含量均显著低于 ZJU0115 的结果相吻合。至于 ZJU0115(HD) 和 ZJU0115 细胞内多磷酸盐颗粒的聚集状态、大小、分布等显著差异是否与藻泥的沥水性能等相关, 还需作专门探索。

2.4 ZJU0115(HD)的 RADP 分析

以 ZJU0115(HD) 及其亲本 ZJU0115 的基因组 DNA 为模板, S₂₄ 等 23 条对螺旋藻 DNA 作 PCR 具清晰电泳条带、明显多态性的 10-mer 寡核苷酸为随机引物, 进行 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 分析, 以检测 ZJU0115(HD) 与 ZJU0115 在分子遗传水平

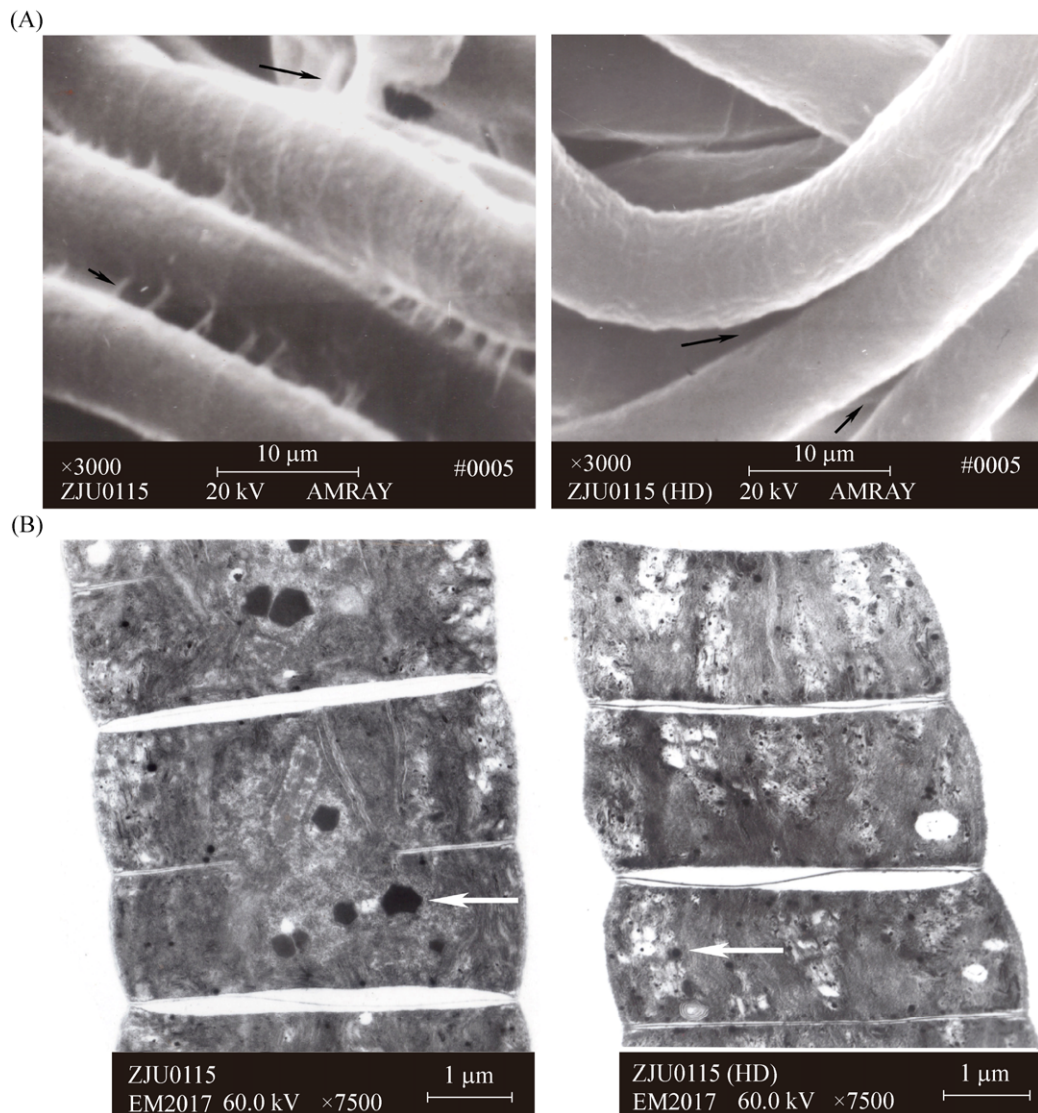


图 2. ZJU0115(HD)及其亲本的扫描和透射电子显微形态

Figure 2. The scanning and transmission electron microscopic morphology of ZJU0115(HD) and its parent.

的差异性。如图 3 所示，除 S₉₀ 扩增产物的电泳图谱中 ZJU0115(HD)比 ZJU0115 少了 1 条约 590 bp 的条带，S₅₈、S₈₃、S₆₇、S₆₆、S₆₅ 和 S₆₄ 等其他 22 条引物对 ZJU0115(HD)和 ZJU0115 扩增的电泳条带均相同。

RAPD 技术可以简便、灵敏地检测基因组 DNA 的多态性，已广泛应用于包括螺旋藻在内许多生物分子标记与鉴定及分类学研究^[14-15,20-21]。虽有学者指出 RAPD 方法的灵敏度高而重复性较

差，但我们经多次重复试验表明，RAPD 结果的重复性主要与实验条件和操作者熟练程度等有关。只要操作熟练，保持反应条件、反应体系所用的试剂来源和浓度一致，并确保反应程序中各环节和各参数的稳定性，重复的结果是不难得到的。此外，对实验中可能出现的假阳性条带给统计分析带来干扰的问题，可通过设置阴性对照(图 3)、改善反应条件或增大样本分析数目等方法来解决。

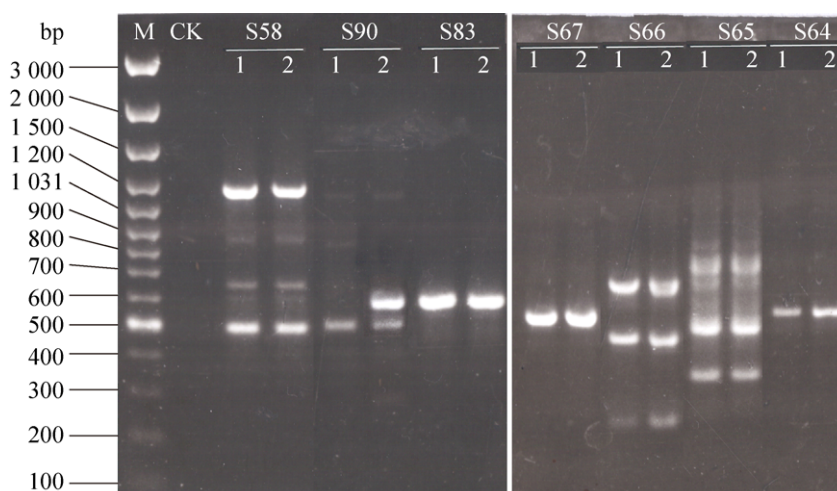


图 3. ZJU0115(HD)及其亲本 ZJU0115 的 RAPD 电泳图谱

Figure 3. RAPD electrophoresis map of ZJU0115(HD) and its parent ZJU0115. M: DNA marker; 1: ZJU0115(HD); 2: ZJU0115; CK: control.

3 结论

本实验室已将 RAPD 技术成功用于螺旋藻的种质鉴定与分类学研究^[14-15]。图 3 中 23 条有效引物对 ZJU0115(HD)和 ZJU0115 的扩增产物仅 1 条有显著的多态性差异, 而其他的则完全一致, 既反映了 ZJU0115(HD)和 ZJU0115 分子遗传背景的高度统一性, 又表明 ZJU0115(HD)确为 ZJU0115 在 DNA 水平发生变异的突变体。目前我们正借助螺旋藻基因组序列等新近研究成果^[22-23], 从上述 RAPD 差异条带序列分析及相关基因克隆等方面开展研究, 以明确 ZJU0115(HD)突变位点并阐明其高沥水性能及超微结构和 EPS 含量等发生变化的分子机理。

参考文献

- [1] Chen J, Wang Y, Benemann JR, Zhang XC, Hu HJ, Qin S. Microalgal industry in China: challenges and prospects. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 715-725.
- [2] Chaiyasitdhi A, Miphonpanyatawichok W, Riehle MO, Phatthanakun R, Surareunghai W, Kundhikanjana W, Kuntanawat P. The biomechanical role of overall-shape transformation in a primitive multicellular organism: a case study of dimorphism in the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *PLoS One*, 2018, 10(5): e0196383.
- [3] Ali M, Sultana R, Tahir S, Watson IA, Saleem M. Prospects of microalgal biodiesel production in Pakistan – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 80: 1588-1596.
- [4] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理. 北京: 科学出版社, 2003.
- [5] 吴开国. 螺旋藻保健食品新资源和开发应用. 海口: 南海出版公司, 1998.
- [6] Bayro-Kaiser V, Nelson N. Microalgal hydrogen production: prospects of an essential technology for a clean and sustainable energy economy. *Photosynthesis Research*, 2017, 133(1/3): 49-62.
- [7] Yao CH, Wu PC, Cao XP, Liu J, Jiang JP, Xue S. Comparative characterization of two *Arthrospira* strains isolated from full-scale raceway pond. *China Biotechnology*, 2017, 37(5): 28-37. (in Chinese)
姚长洪, 吴佩春, 曹旭鹏, 刘娇, 姜君鹏, 薛松. 两株筛自大规模生产跑道池的节旋藻性能比较研究. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(5): 28-37.
- [8] Faucher O, Coupal B, Leduy A. Utilization of sea water-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25(6): 752-759.
- [9] Wang ZP, Xu BJ. Characteristic of resistant ionization-radiation and its relationship with polysaccharide contents in *Spirulina*. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*,

- 2001, 15(4): 229–233. (in Chinese)
汪志平, 徐步进. 螺旋藻的电离辐射抗性及与多糖含量的关系. *核农学报*, 2001, 15(4): 229–233.
- [10] 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. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1998, 12(3): 146–150. (in Chinese)
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. *核农学报*, 1998, 12(3): 146–150.
- [11] Cui HR, Wang ZP, Xu BJ. The effects of ethyl methane-sulphonate on the growth and morphology of *Spirulina platensis*. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, 23(6): 645–648. (in Chinese)
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. *浙江农业大学学报*, 1997, 23(6): 645–648.
- [12] Wang ZP, Jia XM, Fu JJ, Wu YW, Chen SM. The methods of isolation and purification of different morphological filaments of *Spirulina platensis*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 1998, 10(5): 275–277. (in Chinese)
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. *浙江农业学报*, 1998, 10(5): 275–277.
- [13] You S, Zheng BS, Guo SY. Effect of illumination on the growth and EPS of *Spirulina*. *Sea-lake Salt & Chemical Industry*, 2004, 33(1): 23–25, 31. (in Chinese)
尤珊, 郑必胜, 郭祀远. 光照对螺旋藻形态及胞外多糖的影响和机理. *盐湖盐与化工*, 2004, 33(1): 23–25, 31.
- [14] Li JN, Wang ZP. Classification with RAPD marker in *Spirulina*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(2): 203–208. (in Chinese)
李晋楠, 汪志平. RAPD 分子标记技术用于螺旋藻 (*Spirulina*) 分类的研究. *海洋与湖沼*, 2002, 33(2): 203–208.
- [15] Wang ZP, Zhao Y. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (*Cyanophyta*): from linear to helical. *Journal of Phycology*, 2005, 41(3): 622–628.
- [16] Guo YH, Xie LB, Meng FJ, Liu LX, Wang X, Gao YL, Zhou Y, Pang HY. Change of photosynthetic pigment and ultrastructure of sweet pepper leaves after space induction. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2011, 25(2): 237–241. (in Chinese)
郭亚华, 谢立波, 孟凡娟, 刘录祥, 王雪, 高永利, 周宇, 庞洪影. 空间诱变后甜椒叶片光合、色素和超微结构的变
- 化. *核农学报*, 2011, 25(2): 237–241.
- [17] Zhou HN, Xie YG, Wang ZP, Shao B, Liu XY, Yu JX, Chen ZY. Evaluation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* production trait using cpcHID operon. *Pakistan Journal of Botany*, 2013, 45(2): 687–694.
- [18] Yang LY, Wang ZP, Cao XC, Chen XY, Xu BJ. cpcHID operon as a new tool for classification and identification of *Arthrospira platensis* strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6): 1003–1006. (in Chinese)
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. *微生物学报*, 2006, 46(6): 1003–1006.
- [19] Zhang W, Zhang JM, Zhang FQ, Wang TY, Han GY. Effect and mechanism of xanthan gum on osteoarthritis caused by anterior cruciate ligament transection. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(10): 1533–1540. (in Chinese)
张伟, 张军敏, 张富强, 王天一, 韩冠英. 黄原胶对前交叉韧带切断术所致骨关节炎的疗效及其机制. *药学学报*, 2017, 52(10): 1533–1540.
- [20] 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*). *Journal of Phycology*, 1996, 32(6): 1043–1048.
- [21] Wu YM, Wang SY, Dong SR. Phylogenetic comparison between *Spirulina* and *Arthrospira* based on 16S rRNA and *rpoC1* gene. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 232–240. (in Chinese)
吴跃梅, 王素英, 董世瑞. 16S rRNA 及 *rpoC1* 基因用于螺旋藻、节旋藻系统发育的比较. *微生物学报*, 2016, 56(2): 232–240.
- [22] 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. *DNA Research*, 2010, 17(2): 85–103.
- [23] 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. *DNA Research*, 2016, 23(4): 325–338.

Selection and ultrastructure and RAPD analysis of a new *Spirulina platensis* strain with high-efficiency dehydration performance

Chenchen Li¹, Fanyue Wang², Zhiping Wang^{1*}, Qiqi Lu¹, Ziyuan Chen¹

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

² College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] Breeding a new *Spirulina* strain with high-efficiency dehydration performance, and effectively reducing the energy consumption of dry powder production. [Methods] The spheroplasts of *Spirulina platensis* strain ZJU0115 that is widely used in large-scale cultivation, were prepared by tissue homogenate breaking and centrifugal sedimentation. They were treated by 0.6% EMS for 30 min and 2.4 kGy ⁶⁰Co gamma rays, and then screened by Zarrouk's medium containing 0.02% xanthan gum, cultured by the single filament separating, detected of water-holding rate in algae sludge and extracellular polysaccharide (EPS) content in filtrate. [Results] A mutant named ZJU0115(HD) was obtained. The yield and contents of protein and polysaccharide in ZJU0115(HD) were similar to that in ZJU0115, but the sludge water-holding rate and EPS content of ZJU0115(HD) decreased by 5.9% and 29.7% respectively. Ultrastructure analysis showed that the filament surface of ZJU0115(HD) was smoother and had fewer milky-white adhesives considered acidic polysaccharides than that of ZJU0115. And the polyphosphate granules in ZJU0115(HD) cells were significantly smaller and more dispersed. Moreover, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) analysis indicated that the amplification bands of primers S₉₀ revealed significant polymorphisms between ZJU0115(HD) and ZJU0115. [Conclusion] ZJU0115(HD) has good production traits and stable high-efficiency dehydration performance in industrial cultivation. In particular, nearly 50% of the energy consumption of its sludge drying could be saved. The new strain will help promote the current *Spirulina* industry to a new stage of high efficiency, energy saving, green and environmental protection.

Keywords: *Spirulina platensis*, high-efficiency dehydration performance, mutant, breeding, ultrastructure, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771669) and by the Academician Foundation of Zhejiang Province (2016J51701)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-86971021; E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

Received: 25 March 2019; Revised: 30 May 2019; Published online: 11 November 2019