

不同品系杜氏藻的多相特征研究

高帆 尹旭岗 冯佳 吕俊平 刘琪 南芳茹 刘旭东 谢树莲

STUDY ON POLYPHASIC CHARACTERISTICS OF DIFFERENT STRAINS OF *DUNALIELLA*

GAO Fan, YIN Xu-Gang, FENG Jia, L Jun-Ping, LIU Qi, NAN Fang-Ru, LIU Xu-Dong, XIE Shu-Lian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.115>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

混合营养型马勒姆杯棕鞭藻的重描述及其系统发育分析

REDESCRIPTION OF MIXOTROPHIC *POTERIOCHROMONAS MALHAMENSIS* AND ITS PHYLOGENETIC ANALYSIS

水生生物学报. 2020, 44(5): 1130–1142 <https://doi.org/10.7541/2020.131>

鲤sPLA₂-III基因结构、系统发育和表达特征

STRUCTURE, PHYLOGENY AND TISSUE DISTRIBUTION OF SPLA₂-III IN *CYPRINUS CARPIO*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1172–1181 <https://doi.org/10.7541/2019.138>

鳢亚科棒花鱼属鱼类的分类与系统发育关系

TAXONOMY AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE GENUS *ABBOTTINA* FISHES IN THE SUBFAMILY GOBIONINAE

水生生物学报. 2017, 41(4): 843–852 <https://doi.org/10.7541/2017.105>

共生与非共生爪哇伪枝藻对高温胁迫的响应

水生生物学报. 2017, 41(3): 671–676 <https://doi.org/10.7541/2017.85>

青海湖裸鲤舌状绦虫裂头蚴的分子鉴定及系统发育研究

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC STUDY OF *LIGULA INTESTINALIS* PLEROCEROID IN *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* FROM THE QINGHAI LAKE, CHINA

水生生物学报. 2018, 42(1): 33–38 <https://doi.org/10.7541/2018.005>

鳢亚科似鳢属鱼类的物种界定和系统发育关系

SPECIES DELIMITATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *PSEUDOGOPIO* FISHES IN THE SUBFAMILY GOBIONINAE

水生生物学报. 2017, 41(3): 617–628 <https://doi.org/10.7541/2017.79>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.115

不同品系杜氏藻的多相特征研究

高帆 尹旭岗 冯佳 吕俊平 刘琪 南芳茹 刘旭东 谢树莲

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 杜氏藻(*Dunaliella*)是一类独特的嗜盐单细胞真核微藻, 为对该藻不同地理来源各品系间的特征进行总结及分类鉴定, 挖掘特色品系, 研究搜集国内外20株不同品系的杜氏藻, 利用PCR扩增内部转录间隔区(ITS)和细胞色素C氧化酶(*cox2-3*)基因, 生物信息学软件构建系统发育树对其进行分子鉴定; 形态学方法对其显微结构进行观察, 利用生理生化研究方法对杜氏藻盐胁迫下的4个代表性指标(最大光合效率、中性脂含量、 β -胡萝卜素含量和3-磷酸甘油磷酸酶活性)进行了测定。结果表明, 20株供试藻均属杜氏藻属, ITS和*cox2-3*的系统发育结果相似, 均聚为两大簇, 各品系间亲缘关系较为接近; 成熟期的D13细胞最大, D14细胞最小并呈长颈形, 颜色以绿色或黄绿色为主, 鞭毛和眼点各异; D6和D10生长周期短, D18耐盐性最强; D7最大光合效率最高, D6和D18中性脂干重最高, D11的 β -胡萝卜素含量最高, D7的3-磷酸甘油磷酸酶活性最强。研究结果可为国内外杜氏藻资源的分类鉴定、特色资源的保护、开发与利用奠定基础。

关键词: 杜氏藻; 系统发育; 耐盐性; 生理生化

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)04-0925-10



杜氏藻(*Dunaliella*)属于绿藻门(Chlorophyta), 绿藻纲(Chlorophyceae), 团藻目(Volvocales), 杜氏藻科(Dunaliellaceae), 多分布于盐湖、海洋及湿地, 单细胞, 无细胞壁, 可进行无性或有性生殖, 是一类特色微藻资源^[1]。杜氏藻耐盐性较强, 在代谢水平上, 该藻主要通过甘油合成代谢来调节胞内外渗透压平衡^[2]; 在细胞水平上, 该藻可通过质膜ATPase泵驱动钠/氢离子的吸收与释放来响应盐胁迫^[3]; 在分子水平上, 该藻可通过耐盐基因的差异表达来应答不同浓度的盐胁迫^[4]。杜氏藻易繁殖, 可提取天然 β -胡萝卜素、甘油等高附加值产品, 还可固定CO₂, 可有效减缓温室效应, 已广泛应用于食品、医药和化妆品等工业领域^[5]。

目前, 国内外对于杜氏藻属的研究多限于局部范围内部分品系的分类鉴定^[6]、耐盐机理机制的探索^[7]、代谢途径中关键基因挖掘及活性产物的特性研究^[8]。藻类研究者从形态和分子水平已鉴定到杜

氏藻属种类共28个^[9, 10], 然而对于不同地理来源的多种杜氏藻资源, 其多相化分类研究仍然很少, 这在一定程度上限制了国内外杜氏藻的系统分类和多样性研究。杜氏藻广谱耐盐, 研究者们已探索了杜氏藻的部分盐胁迫应答机制, 耐盐基因及其代谢途径^[11-13], 但相关研究多以模式藻株*D. salina*为实验材料^[14, 15], 杜氏藻属的耐盐普通机制仍须系统深入地研究。我国土壤盐渍化严重, 挖掘高耐盐杜氏藻特色品系, 为深入探究其盐胁迫响应普适机制, 进而利用生物手段改良盐碱地具有重要的现实意义。

本研究以国内外不同来源的20株杜氏藻为研究对象, 对其进行形态学、生理生化和分子水平的多相化特征研究, 筛选特色耐盐藻株的同时, 进一步揭示了杜氏藻属不同品系间的系统发育关系。研究结果可为杜氏藻属的分类鉴定、特色资源的筛选与保护、以特色藻株为生物反应器进行活性产物的工业化开发与利用奠定基础。

收稿日期: 2020-05-18; 修订日期: 2020-10-10

基金项目: 山西省应用基础研究项目(201801D221242); 山西省高等学校科技创新项目(2019L0041); 山西省教育厅1331项目资助 [Supported by the Applied Basic Research Programs of Shanxi Province of China (201801D221242); Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi of China (2019L0041); 1331 Programs of Shanxi Province of China]

作者简介: 高帆(1985—), 男, 博士, 高级实验师; 主要从事藻类系统发育及逆境胁迫响应研究。E-mail: gaofan@sxu.edu.cn

通信作者: 谢树莲, 教授; E-mail: xiesl@sxu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

在山西运城盐湖进行采样, 辅以国内外藻种库搜集, 共获得20株不同地理来源的杜氏藻藻株(表1)。

1.2 藻株培养及杜氏藻属鉴定

藻株在分离纯化后, 以实验室前期优化的BG11培养基(3 g/L NaCl, 1.5 g/L NaNO₃, 0.04 g/L K₂HPO₄, 0.075 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.036 g/L CaCl₂·7H₂O, 0.02 g/L Na₂CO₃, 0.006 g/L C₆H₈O₇, 0.006 g/L C₆H₁₀FeNO₈, 1000 mL ddH₂O定容)对20株杜氏藻进行室内扩大培养。在培养过程中定期通过显微镜观察藻株生长状态, 排查有无染菌, 每20天左右注入少量新鲜培养基补充液保证总体积不变。以1株实验室前期已鉴定的*Dunaliella* sp. YC01^[16]为参考, 利用18S rDNA对20株杜氏藻进行属内初步鉴定。利用CTAB法^[17]提取60d左右的藻株DNA, 18S rDNA扩增正向引物: 5'-TTGGGTAGTCGGGCTGGTC-3', 反向引物: 5'-CGCTGCGTTCATCGTT-3'。18S rDNA-PCR的反应体系(25 μL)为: 2.5 μL dNTPs (2 mmol/L), 1.5 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 1 μL DNA, 0.3 μL *Taq*酶(5 U/μL)和2.5 μL 10×反应缓冲液, 1 μL引物对, ddH₂O补齐。PCR反应程序为: 94℃ 5min, 94℃ 40s, 53℃ 40s, 72℃ 1min, 循环35次后72℃延伸10min。扩增产物经华大基因测序验证后, 利用MEGA 6.0及最大似然法(Maximum likelihood)构建系统发育树。

1.3 基于ITS的杜氏藻系统发育分析

ITS序列扩增 同1.2的方法, 提取杜氏藻DNA。设计并合成杜氏藻ITS扩增通用引物对(正向引物: 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3', 反向引物: 5'-TCCTCCCTTATTGATATGC-3')。ITS-PCR反应体系、反应程序同1.2。电泳检测并

收集800—1000 bp特异性扩增产物。纯化后送华大基因测序。

系统发育树构建 ClustalX2.0联合MEGA6.0软件对测序数据进行比对, 利用MEGA6.0软件中Modles模块进行ITS替换矩阵极大似然估计, 根据Tamura-Nei模型估算碱基替代模式和比率^[18]。利用MEGA6.0软件的Distance模块计算遗传距离, 选择成对计算模式。利用MEGA6.0和MrBayes 3.1.2软件, 基于最大似然法、邻接法(Neighbour-joining)和贝叶斯法(Bayesian)分别构建系统发育树, 后验概率表示拓扑结构支持率^[19]。外类群物种选用莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。

1.4 基于cox2-3的杜氏藻系统发育分析

同1.2的方法, 提取杜氏藻DNA。设计并合成杜氏藻*cox2-3*扩增通用引物对(正向引物: 5'-AC CAGCATTATTCTTATTAGTAG-3', 反向引物: 5'-CCAATTAATAATGGTAAAAT-3'), 扩增产物大小约500 bp左右, *cox2-3*-PCR反应体系、反应程序同1.2。外类群物种同样选用莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)。 *cox2-3*的系统发育树构建方法同1.3。

1.5 细胞密度及耐盐性测定

以实验室前期对杜氏藻细胞的监测结果^[16, 20], 利用紫外-可见分光光度计测定685 nm处的藻液吸光值, 绘制OD₆₈₅-藻细胞密度标准曲线, 测算优化培养基配方条件下不同生长时期的杜氏藻细胞密度。富集新鲜藻细胞, 以3×10⁴个/mL接种浓度, 约100 mL的接种量分别接种到含0、0.5、1.0、2.0和4.0 mol/L NaCl的1000 mL BG11培养液中, 最终的NaCl浓度梯度为: 0.005、0.46、0.91、1.82和3.64 mol/L, 每个盐度设置3个平行。

1.6 生理生化指标测定

光合效率测定 参考常毅洪等的方法^[21], 将

表1 国内外不同品系杜氏藻信息

Tab. 1 Information of *Dunaliella* in the world

编号 No.	藻种名称 Species	来源 Origin	采集地 Collection	编号 No.	藻种名称 Species	来源 Origin	采集地 Collection
D1	<i>D. salina</i>	CCAP藻种库	澳大利亚赫特湖	D11	<i>D. salina</i>	上海大学	内蒙古吉兰泰盐湖
D2	<i>D. viridis</i>	CCAP藻种库	印度盐湖	D12	<i>D. viridis</i>	上海大学	新疆艾比湖
D3	<i>D. tertiolecta</i>	CCAP藻种库	挪威峡湾	D13	<i>D. salina</i>	中国水产研究院黄海研究所	运城盐湖
D4	<i>D. bioculata</i>	CCAP藻种库	俄罗斯盐湖	D14	<i>D. salina</i>	中国水产研究院黄海研究所	运城盐湖
D5	<i>D. maritima</i>	CCAP藻种库	罗马尼亚盐湖	D15	<i>D. bioculata</i>	UTEX藻种库	美国盐湖
D6	<i>D. parva</i>	CCAP藻种库	以色列死海	D16	<i>D. salina</i>	中科院水生生物研究所	青岛沿海
D7	<i>D. peircei</i>	CCAP藻种库	美国盐湖	D17	<i>D. salina</i>	山西大学	运城盐湖
D8	<i>D. polymorpha</i>	CCAP藻种库	以色列盐湖	D18	<i>D. salina</i>	山西大学	运城盐湖
D9	<i>D. primiolecta</i>	CCAP藻种库	英格兰沿海	D19	<i>D. salina</i>	山西大学	运城盐湖
D10	<i>D. quartiolecta</i>	CCAP藻种库	英格兰沿海	D20	<i>D. salina</i>	山西大学	运城盐湖

0.46 mol/L NaCl胁迫条件下的藻液在不同生长周期(5d、15d、30d和60d)分别暗适应30min后, 利用MINI-PAM(WALZ, 德国)超便携式调制叶绿素荧光仪测定不同杜氏藻品系的最大荧光产量(F_m), 可变荧光产量(F_v), 计算PSII的潜在最大光合能力(F_v/F_m)。

中性脂含量测定 取0.46 mol/L NaCl胁迫条件下的100 mL成熟期藻液(60d左右), 参考Takagi等^[22]的方法, 测定不同品系杜氏藻的中性脂干重。

β -胡萝卜素含量测定 取0.46 mol/L NaCl胁迫条件下的5 mL成熟期藻液(60d左右), 参考王婷等^[20]的方法分离杜氏藻的 β -胡萝卜素提取液, 绘制OD₄₈₀- β -胡萝卜素含量标曲, 测定不同品系杜氏藻的 β -胡萝卜素含量。

3-磷酸甘油磷酸酶活性测定 取0.46 mol/L NaCl胁迫条件下的5 mL成熟期藻液(60d左右), 参考Hunt等^[23]的方法, 测定3-磷酸甘油磷酸酶活性, 酶活单位以每mg蛋白每小时释放无机磷的 μg 数表示 [$\mu\text{g Pi}/(\text{mg}\cdot\text{pro}\cdot\text{h})$]。

2 结果

2.1 杜氏藻的鉴定与系统发育分析

由20株杜氏藻的18S rDNA系统发育树可知, 所有藻株间的亲缘关系较近(以*Dunaliella* sp. YC01为参考), 均属于杜氏藻属, 可用于下一步种内的系统发育分析。

20株杜氏藻ITS的PCR扩增结果均呈阳性。在杜氏藻ITS基因中, A和G之间的替换率最高(A/G: 13.71, G/A: 14.54), 其他碱基间的替换率较低(表2)。杜氏藻ITS基因间的遗传距离为0.01—0.58。将最大似然树、邻接树和贝叶斯树结合, 以邻接树为模板作为结合树形, 并在节点处辅以3种算法的支持率进行显示(图1A)。杜氏藻ITS系统发育结果显示, 20株杜氏藻品系整体亲缘关系较近(各分支的支持率相对较高, 与外类群显著分离), 大体可分为两簇。第一簇中D19和D20间的支持率达100/1/100, 证实这2个品系确为*D. salina*, D1和D5间的支持率也为100/1/100, 推测它们极可能为同一个品系, 也提示了两者的原始鉴定记录或有偏差。第二簇中D7、D11、D12、D15和D18间的支持率达100/1/100, 表明5株杜氏藻间遗传关系很近, 但其中又有遗传变异存在, 如D7与D12间仍存在部分差异(支持率: 74/-/89)。

20株杜氏藻cox2-3的PCR扩增结果均呈阳性。在杜氏藻cox2-3基因中, G和A、T和C之间替换率最高(A/G: 19.15, T/C: 15.21), 其他碱基间的替换

较低(表3)。杜氏藻cox2-3基因间的遗传距离为0.01—0.68。杜氏藻的cox2-3系统发育结果显示(图1B), 20株品系可划分为两簇且亲缘关系较为接近(各分支的支持率相对较高, 与外类群显著分离)。第一簇的D1、D2、D3、D4、D9和D10遗传关系较近(支持率: 99/-/77), 聚为一个分支; D5、D6、D16和D17则依次单独聚为旁支。第二簇中的D13单独聚为一支, D7与D12聚为另一支且亲缘关系较近(支持率: 99/1/100); D8、D11、D14、D15、D18、D19和D20聚为另一个分支(支持率: 89/1/65), 其中D11与D15亲缘关系极近(支持率: 100/1/100), 推测它们可能属同一品种, 同时也提示两者的原始鉴定记录或有偏差。

2.2 杜氏藻形态多样性

观察20株杜氏藻60d左右的形态(图2A和2B), 总结其主要形态学特征(表4)。

不同品系杜氏藻60d左右的细胞大小显示: D13体型最大(细胞长18—20 μm , 细胞宽: 13—13.5 μm), D4和D14体型最小(细胞长8、9—10 μm , 细胞宽4—5 μm), 体积相差近6倍, 这可能与其品系的天然遗传特征有关, 其他品系则体型差异较小。从细胞形状看, D1、D5、D6、D7、D9、D16、D17、D18、D19和D20为椭圆状, D2、D3、D8、D10、D11、D12和D15为圆形, D4和D1为梨形, D14为长颈形。多样的细胞形态可能与其适应环境渗透压胁迫能力有关。与从细胞颜色看, D1、D4、D6、D7、D12和D20为淡绿色, D5、D11、D16和D17为黄褐色, D2、D15和D19为黄绿色, D3和D14为深绿色, D13和D18为绿色, D8为黄色, D9为灰绿色, D10为淡黄色。细胞微观颜色与宏观藻液颜色多数一致, 少数存在偏差, 这可能与不同的细胞密度有关。从有无鞭毛看, D1、D5、D6、D7、D9、D11、D13、D16、D17和D18具有2条等长的鞭毛; D19与D20只发现1条鞭毛, 其余藻株均未发现鞭毛存在, 表明这些藻细胞未发育或鞭毛退化消失, 游动能力差, 更适合静态水域或湿地生存。D1、D9和D20发现眼点, 其余藻细胞均未发

表2 杜氏藻ITS碱基替换矩阵的极大似然估计

Tab. 2 Maximum likelihood estimation of ITS base substitution matrix in *Dunaliella*

	A	T	C	G
A	—	5.79	6.07	14.54
T	5.79	—	12.38	6.13
C	5.79	11.80	—	6.13
G	13.71	5.79	6.07	—

现,表明这3株品系感光性更强。

2.3 杜氏藻生长周期及耐盐性

由图 3A可知, 20株杜氏藻在0—15d内的细胞密度增长量较低, 平均增幅 $(177\pm 12)\times 10^3/\text{mL}$, 为生长延迟期。在15—50d, 各品系藻细胞密度快速增长, 平均增幅 $(3859\pm 168)\times 10^3/\text{mL}$, 为对数生长期, 其

中D6和D10生长速度最快(第45天左右即达到最大生物量), 可作为工业化快速培养的特色品系。在50—60d, 多数品系的藻细胞生长速度减缓, 各品系藻细胞密度平均增幅 $(590\pm 21)\times 10^3/\text{mL}$, 进入稳定期生长期。从第60天以后, 多数品系的藻细胞密度呈缓慢下降趋势, 仅D15仍缓慢生长, 但增幅仅

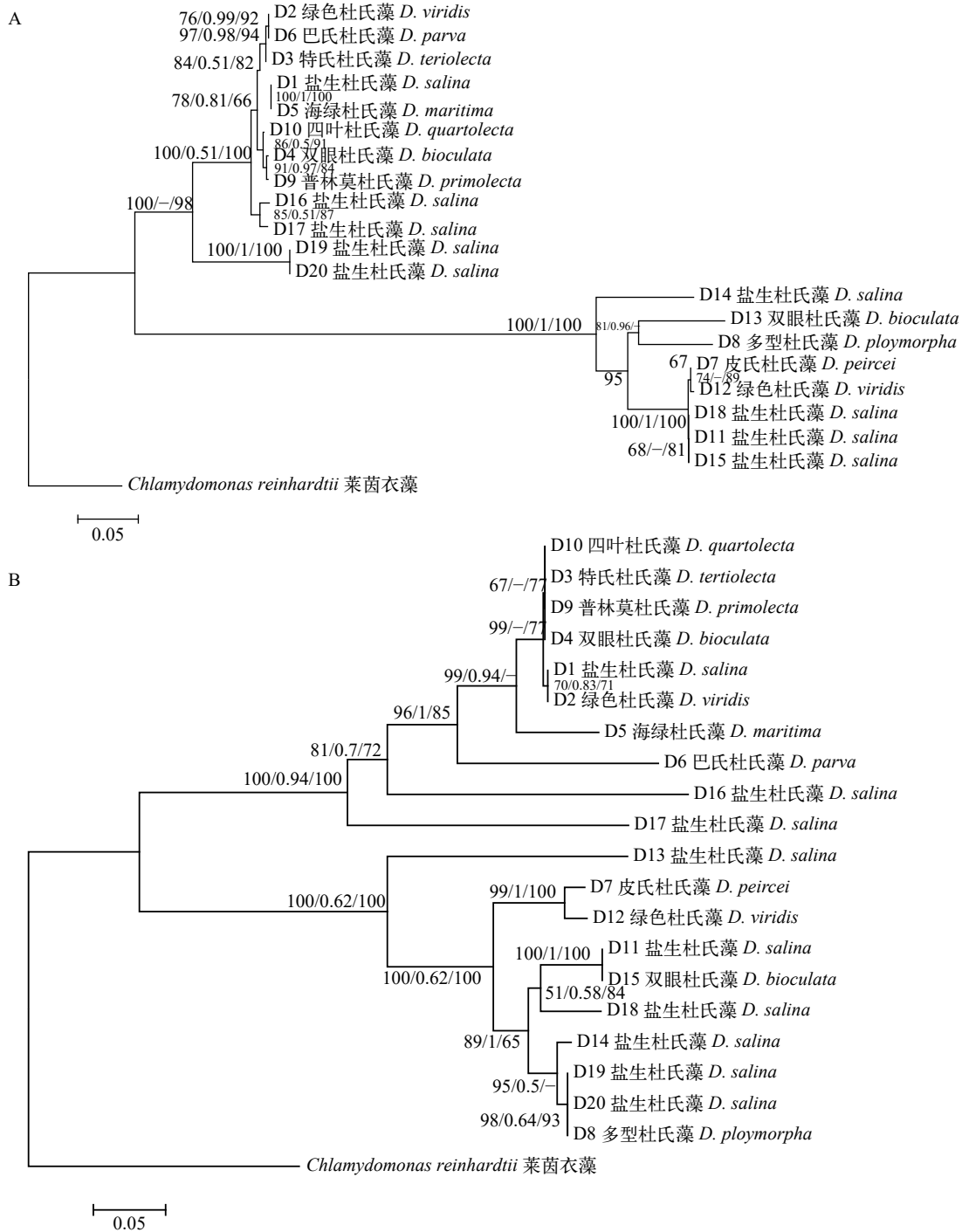


图 1 基于ITS和cox2-3的20株杜氏藻系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of 20 strains of *Dunaliella* based on ITS and *cox2-3*

A. 基于ITS的20株杜氏藻系统发育树; B. 基于cox2-3的20株杜氏藻系统发育树

A. Phylogenetic trees of 20 strains of *Dunaliella* based on ITS; B. phylogenetic trees of 20 strains of *Dunaliella* based on *cox2-3*

$(140\pm 8)\times 10^3/\text{mL}$, 显示其生长能力较差。

由图 3B 可知, 在杜氏藻的成熟生长期(60d 左右), 不同品系的耐盐性各不相同。在微量 NaCl (0.005 mol/L NaCl)胁迫条件下, D2 藻细胞密度最大, 达 $(1107\pm 10)\times 10^3/\text{mL}$, 显示该品系也可适应淡水环境。在 0.46 和 0.91 mol/L NaCl 胁迫条件下, D6 藻细胞密度均最大, 分别达到 $(4947\pm 17)\times 10^3/\text{mL}$ 和 $(4767\pm 24)\times 10^3/\text{mL}$, 表明该藻株为低耐盐品系。在 1.82 mol/L NaCl 胁迫条件下, D5 藻细胞密度最大, 达 $(3507\pm 17)\times 10^3/\text{mL}$, 表明该藻株为中度耐盐品系。在 3.64 mol/L NaCl 胁迫条件下, D18 藻细胞密度最大, 达 $(1564\pm 13)\times 10^3/\text{mL}$, 表明其为高耐盐品系, 适合作为藻类耐盐机制研究的实验材料。

表 3 杜氏藻 *cox2-3* 碱基替换矩阵的极大似然估计

Tab. 3 Maximum likelihood estimation of *cox2-3* base substitution matrix in *Dunaliella*

	A	T	C	G
A	—	8.97	3.82	8.09
T	8.96	—	6.48	3.79
C	8.96	15.21	—	3.79
G	19.15	8.97	3.82	—

2.4 杜氏藻生理生化特征

由图 4A 可知, 不同生长阶段的杜氏藻最大光合效率各不相同, 总体变化趋势是先下降后升高。在第 5 天, D9 的 F_v/F_m 值最大 (0.62 ± 0.082), 表明该品系在生长延迟期光合效率较高。在第 15、30 和 60 天, D7 的 F_v/F_m 值均最大, 分别达到 0.28 ± 0.079 、 0.23 ± 0.059 和 0.55 ± 0.130 , 表明该品系在整个生长周期内(延迟期除外)的光合效率最高。

一般来说, 杜氏藻生物量越大, 胞内中性脂积累量越高^[24]。因此, 杜氏藻成熟期的中性脂含量侧面反映了其产脂能力。由图 4B 可知, D6 和 D18 的中性脂干重最高, 分别达到 (2.77 ± 0.044) 和 $(2.78\pm 0.028) \text{ mg/mL}$, 属于高产油品系, 适合用于藻类生物柴油的开发与利用。D15 的中性脂干重最低, 仅 $(1.36\pm 0.035) \text{ mg/mL}$, 为低产油品系。

同中性脂积累相似, 杜氏藻成熟期的 β -胡萝卜素含量反映了其二次代谢产物的产出能力^[25]。由图 4C 可知, D11 的 β -胡萝卜素含量最高, 每 100 mL 藻液可提取 β -胡萝卜素 $(86.26\pm 2.05) \text{ mg}$, 可作为 β -胡萝卜素生产加工的适用品系。

3-磷酸甘油磷酸酶是杜氏藻甘油合成代谢的关键酶之一^[26], 其酶活力的测定对于高产油杜氏藻

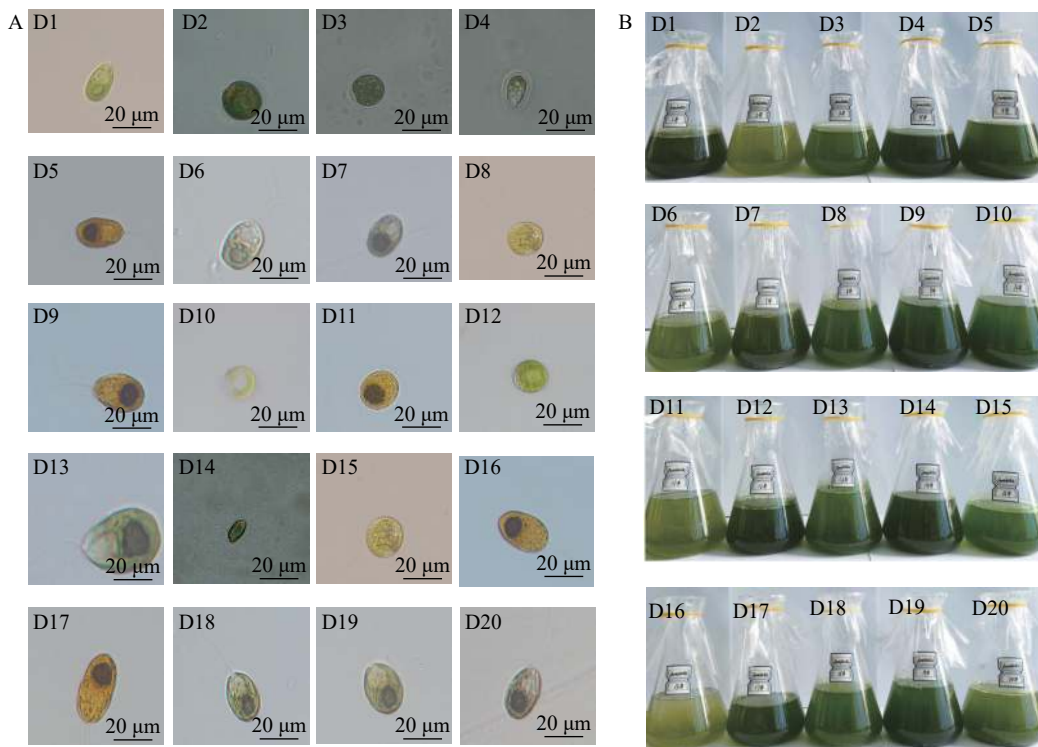


图 2 20 株杜氏藻成熟期形态

Fig. 2 Morphology of 20 strains of *Dunaliella* at maturity phase

A. 20 株杜氏藻显微形态(0.46 mol/L NaCl 胁迫); B. 20 株杜氏藻生长状态(0.46 mol/L NaCl 胁迫)

A. Micromorphology of 20 strains of *Dunaliella* under 0.46 mol/L NaCl stress; B. growth of 20 20 strains of *Dunaliella* under 0.46 mol/L NaCl stress

表4 杜氏藻细胞形态指标

Tab. 4 Morphological indicators of *Dunaliella* cells

编号 No.	细胞大小 Cell size (μm)	细胞形状 Cell shape	鞭毛数量 Flagellum No.	细胞颜色 Cell colour	眼点 Eye-spot
D1	长: 12—14; 宽: 6—8	椭圆形	2	淡绿色	有
D2	长: 13—15; 宽: 11—12	圆形	0	黄绿色	无
D3	长: 11—13; 宽: 12—13	圆形	0	深绿色	无
D4	长: 8—10; 宽: 4—5	梨形	0	淡绿色	无
D5	长: 13—14; 宽: 7—9	椭圆形	2	黄褐色	无
D6	长: 13—15; 宽: 8—10	椭圆形	2	淡绿色	无
D7	长: 14—16; 宽: 8—10	椭圆形	2	淡绿色	无
D8	长: 11—13; 宽: 11—13	圆形	0	黄色	无
D9	长: 14—15; 宽: 8—9	椭圆形	2	灰绿色	有
D10	长: 12—13; 宽: 12—13	圆形	0	淡黄色	无
D11	长: 13—15; 宽: 12—13	圆形	2	黄褐色	无
D12	长: 12—13; 宽: 12—12.5	圆形	0	淡绿色	无
D13	长: 18—20; 宽: 13—13.5	梨形	2	绿色	无
D14	长: 9—10; 宽: 4—5	长颈形	0	深绿色	无
D15	长: 12—13; 宽: 11—12	圆形	0	黄绿色	无
D16	长: 13—15; 宽: 8—9	椭圆形	2	黄褐色	无
D17	长: 15—14; 宽: 8—8.5	椭圆形	2	黄褐色	无
D18	长: 14—16; 宽: 7—8	椭圆形	2	绿色	无
D19	长: 14—15; 宽: 8—8.5	椭圆形	1	黄绿色	无
D20	长: 13—13.5; 宽: 8—10	椭圆形	1	淡绿色	有

注: 长和宽分别为0.46 mol/L NaCl胁迫下的60d左右藻细胞的最长和最宽值

Note: The long and wide values indicate the maximum values of algal cells at ~60d under 0.46 mol/L NaCl stress, respectively

特性的研究可提供参考。由图4D可知, 成熟期的D7在90min内酶活力均处于较高水平, 最高达27.38 μg Pi/(mg·pro·h)(75min), 结合其较高的中性脂积累能力(2.64±0.033) mg/mL(图4B), 推测该藻株亦属高产油品系, 可作为微藻脂类代谢的实验研究。

3 讨论

ITS序列是植物系统分类研究中常用的参考基因, *cox2-3*则常用于动物物种的分类学研究。藻类尤其是鞭毛藻从进化上更接近于植物, 但从功能上又有原生动物的某些特征^[27]。鉴于此, 本研究同时选用上述2种基因并结合3种不同算法对20株杜氏

藻资源进行系统发育研究。为避免生物数据库相关藻类基因信息的误差, 本研究对20株藻的ITS和*cox2-3*基因进行了重新扩增并测序, 增加了结果的可信度。从2个基因的分析结果看, 2种系统发育分析结果整体较一致, 海洋品系(D3、D9和D10)在2种预测结果中均聚为一簇, 其他盐湖品系的聚类结果无显著与地理性相关的特征。本研究的杜氏藻系统发育结果较以往研究者利用传统单一基因联合已报道生物数据建树结果^[6, 10]更加可靠, 适用于藻类, 尤其是微藻的系统发育研究。

张会永等^[28]对7株杜氏藻的RAPD分析结果发现, *D. bioculata*、*D. parva*、*D. pericei*和*D. primolecta*亲缘关系较近。上述藻株对应本研究品系分别为D4/D15、D6、D7和D9。2种基因的系统发育结果同时显示, D4、D6和D9聚为一类, D7和D15聚为一类, 这部分验证了张会永等^[28]的研究结果, 差异可能是由于系统分类的遗传标记不同所致。*D. pericei*与其他杜氏藻品系的遗传关系仍待进一步研究。王伟等^[6]、姜玮等^[29]和王冬梅等^[30]通过不同基因的系统进化分析发现, *D. viridis*与其他杜氏藻品系间亲缘关系均较近。本研究利用2种不同的基因构建系统发育树, 发现2种建树结果中, 2株*D. viridis*品系(D2和D12)同时分别被划分在2个不同的分支且与其他品系亲缘关系较近, 这提示了*D. viridis*可能是20株品系中更古老的种类。鉴于搜集的少数杜氏藻种类与系统发育结果不一致, 我们不排除藻株最初鉴定结果有误差。目前, 模式杜氏藻*D. salina*的细胞器基因组^[31]和核基因组序列(版本: NS-FN0000000.1)已经公布, 下一步搜集全球范围内更多杜氏藻资源, 利用基因组重测序或泛基因组技术对其进行基因组或泛基因组水平的进化分析, 将有助于全面揭示杜氏藻属的起源与进化问题。

20株杜氏藻细胞形态整体相似, 但仍有一定差异, 其原因首先可能是遗传变异的影响, 这种影响可能不仅局限于不同种间, 同种不同品系间的差异也会存在, 如D13和D14同为*D. salina*, 但前者细胞体积远大于后者, 而后者细胞形态呈独特的长颈形。其次, 尽管杜氏藻广谱耐盐, 但当不同品系遭遇不同浓度盐胁迫时, 细胞形态可能发生适应性改变, 这种改变可能与藻细胞调节渗透压平衡的能力有关。另外, 一些品系观察到鞭毛和眼点, 鞭毛(含信号转导和能量代谢相关蛋白)和眼点(具感光性)均有助于杜氏藻逃逸或应答不利环境^[32], 而稳定的栖息环境往往可能导致它们的功能退化甚至突变消失。

综合20株杜氏藻资源的耐盐性及4项代表性生

理化指标值, 我们发现, 耐盐性越强的品系, 其中性脂的积累量及3-磷酸甘油磷酸酶活性往往较高。研究显示^[33], 脂类代谢尤其是甘油酯代谢与杜氏藻的耐盐性紧密相关, 高渗透压环境往往加速了藻细胞的脂代谢过程及相关酶活性, 而大量的油脂

又进一步缓解了细胞膜的渗透压, 保证藻细胞耐受高盐环境。光合效率较强的杜氏藻细胞, β -胡萝卜素合成量一般较高。作为类胡萝卜素的一种, β -胡萝卜素合成量往往提示了该藻株的可见光吸收能力, 光合效率主要反映细胞对叶绿素合成代谢水平^[34],

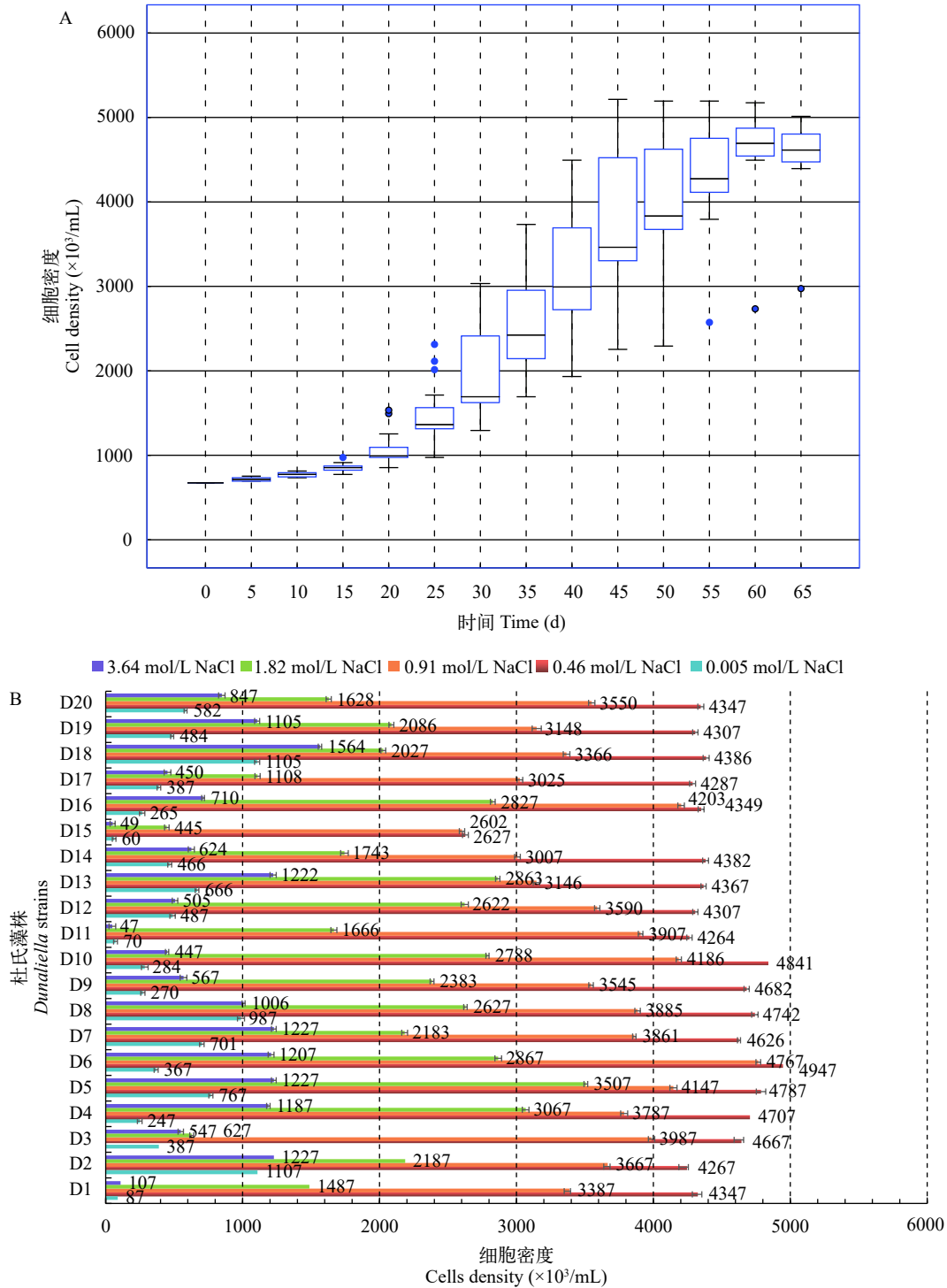


图 3 20株杜氏藻细胞密度及耐盐性

Fig. 3 Cell density and salt tolerance of 20 strains of *Dunaliella*

A. 20株杜氏藻不同生长期细胞密度; B. 20株杜氏藻成熟期耐盐度

A. Cells density of 20 strains of *Dunaliella* in different growth phases; B. salt tolerance of 20 strains of *Dunaliella* in the mature phase

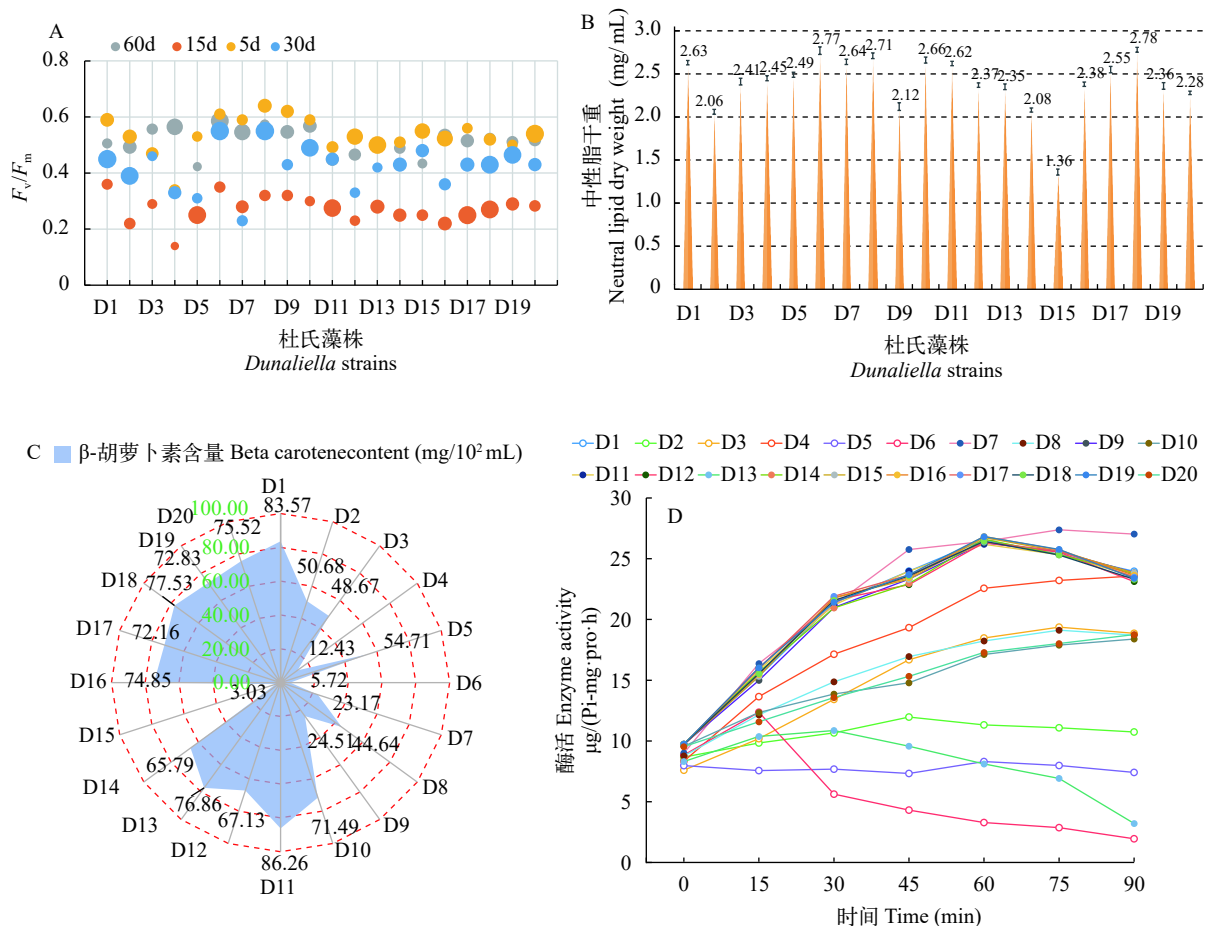


图 4 20株杜氏藻生理生化指标测定

Fig. 4 Determination of physiological and biochemical indexes of 20 strains of *Dunaliella*

A. 20株杜氏藻不同生长时期的最大光合效率; B. 20株杜氏藻成熟期中性脂干重; C. 20株杜氏藻成熟期β-胡萝卜素积累量; D. 20株成熟期杜氏藻不同时间3-磷酸甘油磷酸酶活性

A. Max photosynthetic efficiency of 20 strains of *Dunaliella* during different growth phases; B. neutral lipid dry weight of 20 strains of *Dunaliella* in the mature phase; C. β-carotene accumulation of 20 strains of *Dunaliella* in the mature phase; D. 3-phosphate phosphatase activities of 20 strains of *Dunaliella* at different times in the mature phase

两者有一定的联系但并非完全正相关。

4 结论

本研究以国内外不同地理来源的20株杜氏藻资源为研究对象,从系统发育、形态和生理生化水平对其进行多相特征研究。结果表明,20株杜氏藻的ITS和cox2-3系统发育树均划分为2大簇,尽管少数品系拓展支持率略有差异,但各品系间的亲缘关系仍较为相近。杜氏藻形态多样,其中D13细胞体积最大,D14体积最小且呈独特长颈形,藻细胞颜色多以绿色或黄绿色为主,一些品系不具鞭毛和眼点。D6和D10生长速率快,可用于杜氏藻工业化大规模培养。D18耐盐性最强,可用于耐盐基因挖掘与盐胁迫响应机制的深入研究。在优化培养条件下,D7最大光合效率最高,可用于杜氏藻光合与呼吸作用的研究。D6和D18富油能力最强,可用作生

物柴油研制的特色材料。D11的β-胡萝卜素含量最高,可作为工业提取胡萝卜素的生物原料。D7的3-磷酸甘油磷酸酶活性最强,可用于杜氏藻甘油酯代谢调控机制的研究。研究结果为杜氏藻资源的挖掘与保护,特色品系工业化开发与利用奠定了基础。

参考文献:

[1] Cho K, Kim K N, Lim N L, *et al.* Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina* [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015(72): 1-7.
 [2] Fei Q, Chang H N, Shang L, *et al.* Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(3): 482-487.
 [3] Katz A, Kaback H R, Avron M. Na⁺/H⁺ antiport in isolated plasma membrane vesicles from the halotolerant

- alga *Dunaliella salina* [J]. *FEBS Letters*, 1986, **202**(1): 141-144.
- [4] Fang X D, Huang W, Lin Q F, *et al.* Isolation and identification of genes involved in salt-adaptation of *Dunaliella salina* by cDNA RDA [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, **20**(1): 67-72. [方孝东, 黄薇, 林栖凤, 等. cDNA RNA法分离和识别盐藻 (*Dunaliella salina*) 盐胁迫相关基因 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**(1): 67-72.]
- [5] Feng S Y, Liu H T, Li J, *et al.* Research status and application prospect of gene engineering in *Dunaliella salina* [J]. *China Biotechnology*, 2007, **27**(2): 108-112. [冯书营, 刘红涛, 李杰, 等. 杜氏盐藻基因工程研究现状及应用前景 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(2): 108-112.]
- [6] Wang W, Xu Z K, Song R T. Identification of two *Dunaliella* sp. based on nuclear ITS rDNA sequences [J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science)*, 2006, **12**(1): 84-88. [王伟, 许政暄, 宋任涛. 利用ITS序列对两个盐藻株的分子鉴定 [J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2006, **12**(1): 84-88.]
- [7] El Arroussi H, Benhima R, Bennis I, *et al.* Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress [J]. *Renewable Energy*, 2015(77): 15-19.
- [8] Chai Y R, Wang T Y, Xue L X. Recent progress in a new bioreactor: *Dunaliella salina* [J]. *China Biotechnology*, 2004, **24**(2): 30-33. [柴玉荣, 王天云, 薛乐勋. 新型生物反应器杜氏盐藻研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(2): 30-33.]
- [9] Lü W B. Preliminary functional analysis and characterization of heterotrophic transformation algal strains of *Dunaliella salina* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010: 2. [吕文兵. 杜氏盐藻异养转化藻株的鉴定及初步功能分析 [D]. 郑州: 郑州大学, 2010: 2.]
- [10] Wang F P. Algal flora of Yuncheng salt lake water system and phylogenetic and classification of *Dunaliella* sp. YC01 [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014: 3. [王飞鹏. 运城盐湖藻类区系及*Dunaliella* sp. YC01分类研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014: 3.]
- [11] Liu H T, Feng S Y, Chen T, *et al.* Prospect and progress on *Dunaliella salina* in the area of molecular biology [J]. *China Biotechnology*, 2007, **27**(10): 113-118. [刘红涛, 冯书营, 陈涛, 等. 杜氏盐藻分子生物学最新进展及展望 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(10): 113-118.]
- [12] Geng D G, Han Y, Wang Y Q, *et al.* Progress in studies on salt resistant mechanism and prospects of gene engineering of *Dunaliella salina* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, **19**(3): 290-295. [耿德贵, 韩燕, 王义琴, 等. 杜氏盐藻的耐盐机制研究进展和基因工程研究的展望 [J]. *植物学通报*, 2002, **19**(3): 290-295.]
- [13] Chen H, Jiang J. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, **219**(2): 251-258.
- [14] Mishra A V, Mandoli A, Jha B. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from Salt Pan [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, **35**(10): 1093-1101.
- [15] Salama E S, Kabra A N, Ji M K, *et al.* Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones [J]. *Bioresource Technology*, 2014(172): 97-103.
- [16] Wang F P, Feng J, Xie S L. Phylogenetic and morphological investigation of a *Dunaliella* strain isolated from Yuncheng salt lake [J]. *China Plant*, 2014, **2**(2): 20-26.
- [17] Adachi J, Waddell P J, Martin W *et al.* Plastid genome phylogeny and a model of amino acid substitution for proteins encoded by chloroplast DNA [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000(50): 348-358.
- [18] Chai Y, Deng W J, Qin X, *et al.* Occurrence of four species of algae in the marine water of Hong Kong [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, **124**(2): 890-896.
- [19] Alberghina J S, Vigna, M S. Confalonieri V A. Phylogenetic position of the Oedogoniales within the green algae (Chlorophyta) and the evolution of the absolute orientation of the flagellar apparatus [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006(261): 151-163.
- [20] Wang T, Feng J, Xie S L. Effects on culture conditions for β -carotene contents of *Dunaliella* sp. [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, **35**(24): 177-181. [王婷, 冯佳, 谢树莲. 培养条件对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 [J]. *食品工业科技*, 2014, **35**(24): 177-181.]
- [21] Chang Y H, Zhao P F, Wang R, *et al.* Comparison of photosynthetic characteristics and fluorescence parameters of grafted 'Luoyang Hong' on two rootstocks [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2019, **47**(6): 89-96. [常毅洪, 赵鹏飞, 王锐, 等. 两种根植嫁接'洛阳红'光合特性与叶绿素荧光参数的比较 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2019, **47**(6): 89-96.]
- [22] Takagi M, Yoshida K. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **101**(3): 223-226.
- [23] Hunt R W, Chinnasamy S, Das K C. The effect of naphthalene-acetic acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, *Coccolithophore*, *Diatom*, and *Cyanobacterium* cultures [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, **164**(8): 1350-1365.
- [24] Wei F S, Li C H, Dai M, *et al.* Effects of salinity change on the biomass and lipid content of *Dunaliella salina* [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2011(1): 134-136. [韦芳三, 李纯厚, 戴明, 等. 盐度变化对盐藻生物量和总脂含量的影响 [J]. *湖南农业科学*, 2011(1): 134-136.]
- [25] Fazeli M R, Tofighi H, Samadi N, *et al.* Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran [J]. *Bioresource Technology*, 2006, **97**(18): 2453-2456.
- [26] Jayawardhane K N, Singer S D, Weselake R J, *et al.* Plant

- sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases: biocatalysts involved in the biosynthesis of intracellular and extracellular lipids [J]. *Lipids*, 2018, **53**(5): 469-480.
- [27] Merchant S S, Prochnik S E, Vallon O, *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions [J]. *Science*, 2007, **318**(5848): 245-250.
- [28] Zhang H Y, Liu G F, Lin H X, *et al.* RAPD analysis in the genus *Dunaliella* (Chlorophyte) [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2001, **40**(6): 1289-1294. [张会永, 刘广发, 林慧馨, 等. 杜氏藻种间关系 RAPD 分析 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, **40**(6): 1289-1294.]
- [29] Jiang W, Li Y, Sun H M. Halotolerance of *Dunaliella viridis* and the effects of hyperosmotic stress on its protein expression [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(Suppl.): 347-352. [姜玮, 李赟, 孙红梅. 绿色杜氏藻的盐度耐受性及高盐胁迫对其蛋白表达的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(增): 347-352.]
- [30] Wang D M, Wang W W, Sun X, *et al.* Molecular identification and halophilic characteristics of a strain of *Dunaliella* D3 [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, **50**(3): 315-323. [王冬梅, 王玮蔚, 孙雪, 等. 一株杜氏藻的分子鉴定与耐盐特性 [J]. 植物生理学报, 2014, **50**(3): 315-323.]
- [31] Smith D R, Lee R W, Cushman J C, *et al.* The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, **10**(1): 83.
- [32] Gong F, Wang J, Li J. Isolation and characterization of peroxiredoxin 1 gene of *Dunaliella salina* [J]. *Gene*, 2017(635): 39-45.
- [33] Chen M, Tang H, Ma H, *et al.* Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(2): 1649-1655.
- [34] Jiménez C, Cossío B, Rivard C, T. *et al.* Cell division in the unicellular microalga *Dunaliella viridis* depends on phosphorylation of extracellular signal regulated kinases (ERKs) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(5): 1001-1011.

STUDY ON POLYPHASIC CHARACTERISTICS OF DIFFERENT STRAINS OF *DUNALIELLA*

GAO Fan, YIN Xu-Gang, FENG Jia, LÜ Jun-Ping, LIU Qi, NAN Fang-Ru, LIU Xu-Dong and XIE Shu-Lian

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: *Dunaliella* is a unique group of halophilic, unicellular, eukaryotic microalgae, which is widely used in industrial field because of its rich bioactive substances such as oil, β -carotene, and polysaccharides. *Dunaliella* resources are diverse in the world. The morphological difference of *Dunaliella* species is small. Therefore, their taxonomy and identification need to be improved. *Dunaliella* is broad-spectrum salt tolerant, but physiological and biochemical responses of different species under salt stress are different. It is necessary to excavate the unique *Dunaliella* strains. We collected 20 strains of *Dunaliella* from home and abroad. Gene sequences of internal transcribed spacer (ITS) and cytochrome C oxidase (cox2-3) were amplified by PCR. The phylogenetic trees of *Dunaliella* based on the two genes were constructed by bioinformatics analysis. We used morphological methods to identify their microscopic and submicroscopic structures. Four representative indexes (max photosynthetic efficiency, neutral lipid content, β -carotene content and glycerol 3-phosphate phosphatase activity) of *Dunaliella* under salt stress were measured via physiological and biochemical analysis. The results showed that all algae strains belonged to *Dunaliella*. phylogenetic analysis of *Dunaliella* results based on ITS and cox2-3 given similar results. The genetic relationships of 20 *Dunaliella* strains were relatively close. D13 cells were the largest, and D14 cells were the smallest with a long neck. The color of *Dunaliella* cells was mainly green or yellow-green. The numbers of Flagella and eye-spot of them were different. D6 and D10 had the shortest growth period. The most salt tolerant strain was D18. D7 had the highest max photosynthetic efficiency. D6 and D18 had the highest dry weights of neutral lipid. D11 had the highest β -carotene content, and D7 had the strongest glycerol 3-phosphate phosphatase activity. Our research lays the foundation for the taxonomy, identification, protection, development and utilization of *Dunaliella* resources in the world.

Key words: *Dunaliella*; Phylogeny; Salt tolerance; Physiology and Biochemistry