

螺旋藻遗传育种研究进展*

汪志平

(浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

钱凯先

(浙江大学生命科学学院 杭州 310027)

关键词: 螺旋藻, 遗传育种

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)04-0288-04

螺旋藻(*Spirulina*)属蓝藻门、颤藻科,是一种光合放氧的丝状蓝细菌。因其富含优质蛋白(60%~70%)和多种生物活性物质,而受到了国内外的极大关注,近年来已在大量研究的基础上形成了以工厂化养殖和深加工为主体的螺旋藻产业。如何进一步降低养殖成本和开发多种适合市场需求的产品,是目前螺旋藻产业发展中急需解决的重要问题。利用现代生物技术选育品性兼优的新藻种是解决上述问题的有效途径,也是当前国际上螺旋藻领域的研究热点之一。本文概述了近年来国内外有关螺旋藻原生质球制备与再生、基因工程育种及诱变育种等方面的研究进展。

1 原生质球(spheroplasts)的制备与再生

植物原生质体(protooplasts)是遗传操作的有力工具,是育种工作中利用基因工程和诱发突变等现代生物技术对种质进行遗传改良的理想材料。因此,制备高质量且具再生能力的螺旋藻原生质球,对开展螺旋藻的分子遗传学和育种研究都是至关重要的。

1982年Robinson首先提出了酶解制备钝顶螺旋藻(*S. platensis*)原生质球的方法,1989年Lanfalconi等^[1]对*S. platensis*原生质球的制备和再生进行了研究。他们先用1.5mol/L的NaCl溶液洗去藻丝表面的外鞘套,后用溶菌酶进行酶解,再用牛血清蛋白梯度离心法从酶解液中分离出高纯度的原生质球,活性率达4%~12%。并发现幼嫩细胞比老化细胞更适用于制备原生质球,由幼嫩细胞制得活性原生质球的再生率高达

40%~70%,而由老化细胞制得活性原生质球的再生率仅为10%~40%。1994年P. Sethu等^[2]以甘露醇为渗透稳定剂,在pH6.8的磷酸缓冲液中用溶菌酶酶解藻丝28h,再用蔗糖密度梯度离心获得了原生质球,但以这种原生质球的再生率未作报道,可能是在甘露醇中酶解时间太长,对细胞有毒害作用而不一定能再生。1996年彭国宏等^[3]进一步证明甘露醇和高浓度的NaCl或KCl(1.2mol/L以上,35℃)对螺旋藻均有伤害作用,可导致藻丝体大量断裂,并因在甘露醇浓度为0.5~1.5mol/L、溶菌酶浓度为0.5%~1%(W/V)及pH为6~8的条件下做了多次实验均未能分离出原生质球,而对上述有关螺旋藻原生质球分离的报道产生了怀疑。此后,他们先用机械法将藻丝打断,后用酸性溶液洗去藻丝外层的胶状物(分离原生质球的主要障碍之一),再在渗透稳定剂为0.8mol/L KCl的磷酸缓冲液中,用0.5%溶菌酶和1%果胶酶协同处理2~6h,获得了大量活性率高达98%的原生质球,并对它们的光合作用特性作了研究,但也未报道其再生率。此外,秦松等用超声波处理*S. platensis*藻丝制得了原生质球并再生成功,但也因此法原生质球的得率太低而难以应用于遗传育种研究。

总之,国内外在螺旋藻原生质球的制备和再生方

* 浙江省“九五”重点项目资助

收稿日期: 1999-08-12, 修回日期: 1999-10-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

面虽然作了一些工作,但到目前为止,尚不能可靠地制备出质量高且具再生能力的螺旋藻原生质球,供遗传育种所需。

2 基因工程育种

基因工程是改良和创建生物技术良种的有力武器。有关螺旋藻的基因识别和克隆研究方面已取得了不少有意义的结果^[4]。光合作用过程中固定CO₂的关键酶—核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase)大亚单位和小亚单位的基因已成功地从*S. platensis*中克隆出来,并在*E. Coli*中获得表达;秦松等已从螺旋藻中分离出别藻蓝蛋白

(allophycocyanin)基因,作了序列分析,并已通过构成融合蛋白的方式实现了在*E. Coli*中的高效表达。同时,在螺旋藻质粒研究方面也取得了一些进展,秦松等^[5]已分别从*S. platensis* S₆和F₃藻株中分离到2.40kb和1.78kb的CCC(共价闭合环状)质粒。然而,至今还不能象高等植物那样,将基因工程这一先进技术应用于螺旋藻的品种改良,原因主要有三:(1)螺旋藻完整的基因图谱尚未构建,对其整个基因组尚缺乏系统认识;(2)还没有找到合适的限制性内切酶来对所发现的CCC质粒进行深入研究,也未发现该质粒的功能(隐密型质粒),更未构建出理想的转基因载体;(3)尚不能制

表1 利用诱发突变技术获得的螺旋藻突变体

类型	突变体特性	诱变因素	所用材料	作者	时间	文献
抗氨基酸类 似物的突变 体(约300株)	对氨基酸类似物有 抗性,某些氨基酸 含量增加,抗盐	1-甲基-3-硝 基-1-亚硝基 胍(MNNG)	<i>S. platensis</i> 藻丝体	Riccardi G, Sora S, et. al.	1981 1983	[7]
	形态变异 突变体	藻丝变长, 上浮性好	γ-射线	<i>S. platensis</i> 单细胞	胡天赐, 杨世杰等	1990 [8]
耐低温突 变体(2个)	低温下能快速生 长,形态变异	甲基磺酸 乙酯(EMS)	<i>S. platensis</i> 藻丝体	张学成, 谭桂英等	1990	[9]
抗高光抑制 突变体(2株)	藻丝变短,高光 合、低呼吸、生长快	γ-射线	<i>S. platensis</i> 藻丝体	龚小敏, 胡鸿钧	1996	[10]
形态变异 突变体	藻丝变长,螺旋加 长,螺旋数增多	EMS	<i>S. platensis</i> 藻丝体	崔海瑞, 汪志平等	1997	[11]
富含藻蓝蛋 白的突变体	藻丝变长,藻蓝蛋 白和SOD含量提高	紫外线	<i>S. maxima</i> 藻丝体	Li Jianhong, Zheng Wei, et.al.	1997	[12]
耐低温的 中温品系	更耐低温,蛋 白质高9.5%	亚硝基胍 (NTG)	<i>S. platensis</i> 单细胞	殷春涛, 胡鸿钧等	1997	[13]
耐低温 突变体	细胞宽大,能在 低温下良好生长	γ-射线	<i>S. platensis</i> 藻丝体	汪志平, 徐步进等	1998	[14]
高产、超 长突变体	藻丝长达1cm,采 收极方便,产量提 高11.7%	γ-射线	<i>S. platensis</i> 单细胞或短 的藻丝片段	汪志平, 叶庆富等	1998	[15]

备出外源 DNA 易导入且具再生能力的原生质球。因此,利用基因工程技术创建螺旋藻生物技术良种的前景虽然十分诱人,但还需要做大量的基础研究工作。

值得庆幸的是,近年来在外源 DNA 导入螺旋藻细胞的方法上已取得了一些有意义的结果。Zeng Junzhi^[6]等分别利用超声波处理和电击法将质粒 pBR325 导入到螺旋藻细胞内,并得到了表达;Kumar T A 等用溶菌酶和 EDTA 处理螺旋藻细胞,制得了能实现外源 DNA 导入且能再生成藻丝体的透性体(permeoplasts。相对原生质球而言,残留更多的胞壁),并将 pRSFCmLx 质粒导入其中,获得了表达。最近, Kojima H 等发现螺旋藻中存有转座因子(transposable genetic elements),并提出了先将外源基因整合到转座因子上,再通过转座因子的转座作用实现 DNA 重组的新构想。

3 诱变育种

诱变突变技术及相关生物技术是改良和创建生物技术良种的另一重要手段。国内外在螺旋藻诱变育种方面进行了较深入的研究,并已获得了一些有价值的突变体^[7~14]。由表 1 可见,物理诱变因子(γ -射线,紫外线等)和化学诱变因子(EMS, MNNG 等)均能使螺旋藻藻丝或细胞发生变异,产生高产、耐低温、耐盐、富含某种氨基酸或藻蓝蛋白及藻丝超长等突变体。这些突变体不仅是基础理论研究的好材料,而且也是应用于螺旋藻养殖和深加工的理想品系。

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。研究表明,以超声波或组织匀浆破碎等机械法制得的单细胞或短的藻丝段为诱变材料,与直接以多细胞的螺旋藻藻丝相比,不仅诱变敏感性和诱变率大为提高,而且更有益于突变体的筛选^[8,13,15]。其主要原因可能在于:螺旋藻完整的 DNA 修复系统及细胞壁所含的抗辐射多糖,使其对电离辐射和化学诱变剂均有较强的抗性,而机械作用具有去除细胞壁,甚至可能破坏 DNA 修复系统的生物学效应;螺旋藻藻丝中即使有个别细胞发生了有益突变,也会因与大量的非突变细胞混杂在一起而难以得到表达并被筛选出来^[4]。同时,笔者发现用几种诱变因子对螺旋藻藻丝或细胞进行复合处理,比用单一诱变因子处理更能提高诱变敏感性和诱变率(待发表)。一般认为,利用不同性质的诱变因子处理生物体,可在减轻损伤的同时,使各种诱变因子

的特异作用相互配合,从而提高产生有利突变的频率。

虽然诱变突变技术对遗传物质 DNA 的操作不具有基因工程那么强的针对性,但诱变育种具有所需仪器设备简单、操作简便、成本低、效率高等优点。因此,在当前开展螺旋藻基因操作所需的技术和条件还不完善的情况下,诱变育种仍不失为一种创建螺旋藻生物技术良种的有效而实用的重要手段。

4 展望

近年来,植物基因工程和诱变技术有了很大发展,并在改良植物品种、创建新型种质和发展育种新技术等方面发挥了重要作用,产生了巨大的经济和社会效益^[26]。相比之下,有关螺旋藻等经济微藻的分子遗传学和育种学,则一直缺乏系统而深入的研究。随着螺旋藻应用领域的不断扩大和开发层次的逐渐深入,目前国内许多学者都投身于有关螺旋藻分子遗传学和育种学及相关领域的研究。如秦松等正在构建双向载体,欲将蓝藻植物型脂肪酸脱饱和酶基因导入螺旋藻,培育抗冷新品种,以扩大养殖的地理范围,使其生产在我国从南向北发展。同时,现代分子遗传学和基因工程及相关科学技术极大地推动了诱变技术的迅猛发展,使在分子水平上揭示突变的发生机理、突变体的快速鉴定及实现定向诱变成为可能。因此,螺旋藻育种虽然起步较晚,但已有一个良好的开端,预计在不远的将来,有关螺旋藻的遗传特性会得到更全面而深入的了解,并能在建立和完善螺旋藻育种学理论与方法的基础上,育出品性兼优的生物技术良种,给螺旋藻产业带来新的发展机遇。

参 考 文 献

- [1] Lanfaloni L, Grifantini R, Petris A *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1989, 59:141~146.
- [2] Priya Sethu K M, Prabha T N, Venkataraman L V. Lett in Appl Microbiol, 1994, 18:241~244.
- [3] 彭国宏, 施定基, 费修缙等. 植物学报, 1996, 38(11):861~866.
- [4] 唐欣鸣. 微生物学通报, 1997, 24(5):300~302.
- [5] Qin S, Tong S, Zhang P J *et al.* Chinese J Oceanol Limnol, 1993, 11(3):285~288.
- [6] Zeng J Z, Hu Z M, Wang D W, *et al.* Sino-Japan Symposium on Algal Genetic Engineering and Bioreactors. Qingdao, China. 1997, 18~19.
- [7] Riccardi G, Cella R, Camerino G *et al.* Plant &