

基于ITS分子标记的鄂尔多斯地区节旋藻系统发育分析

张竞男,薛慧婷,霍达,苑红,马春丽,扈瑞平*

(内蒙古医科大学基础医学院,内蒙古呼和浩特 010059)

【摘要】目的 鉴定分别采于鄂尔多斯市巴彦淖尔碱湖的3种藻株,命名为sp.DD、sp.ER、sp.FB;采自哈素海的藻株,命名为sp.HS;获赠于中国海洋大学的藻株命名为sp.QD的5种藻株,并做系统发育分析。**方法** 将采集的藻液进行分离纯化,获得目的藻株,提取基因组DNA,PCR扩增ITS序列片段,进行序列测定和聚类分析。**结果** 系统发育分析表明,sp.HS与*Arthrospira platensis* strain Sp-2在同一支上,同源率为99.59%;sp.DD单独一支,与*Arthrospira platensis* "Inner Mongolia"的同源率为88.01%;sp.QD与*Arthrospira platensis* F3S在同一支上,同源率为99.60%;sp.ER与sp.FB聚为一支,与*Arthrospira erdosensis* "Inner Mongolia"同源率为99.18%。**结论** 经鉴定sp.HS、sp.DD、sp.QD为*Arthrospira platensis*,sp.ER与sp.FB为*Arthrospira erdosensis*,并揭示内蒙古鄂尔多斯地区节旋藻种间的系统发育关系。

【关键词】 鄂尔多斯地区节旋藻;ITS序列;系统发育分析

中图分类号: R949

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2022)02-0118-05

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ARTHROSPIRA FROM ORDOS BASED ON ITS AS A MOLECULAR MARKER

ZHANG Jingnan, XUE Huiting, HUO Da, YUAN Hong, MA Chunli, HU Ruiping*

(College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

【Abstract】 Objective In an attempt to study taxonomic relationships among the five strains including three species from Bayannur alkaline lake in Ordos, named as sp.DD, sp.ER and sp.FB, one species from Hasu Sea in Hohhot named as sp.HS, and another species donated from the Ocean University of China, named as sp.QD. **Methods** The sampled algal liquid was isolated and purified to obtain the target algal strain, and then genome DNA was extracted. ITS sequence fragment was amplified for sequencing and cluster analysis. **Results** Phylogenetic analysis showed that sp.HS and *Arthrospira platensis* strain Sp-2 were on the same branch, the homology similarity was 99.59%, sp.DD was on a single branch, the homology similarity with *Arthrospira platensis* "Inner Mongolia" was 88.01%, sp.QD and *Arthrospira platensis* F3S were on the same branch, the homology similarity was 99.60%, sp.ER and sp.FB were clustered into one branch, the homology similarity with *Arthrospira erdosensis* "Inner Mongolia" was 99.18%. **Conclusions** sp.HS, sp.DD and sp.QD were identified as *Arthrospira platensis*, sp.ER and sp.FB were identified as *Arthrospira erdosensis*. These findings revealed the phylogenetic relationship between *Arthrospira species* from Ordos in Inner Mongolia.

【Keywords】 *Arthrospira* from Ordos; ITS sequence; Phylogenetic analysis

微藻是一种可持续的、相对新颖的食物来源。微藻含有高生物价值的蛋白质、长链多不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、维生素、矿物质和酚类化合物等^[1-3]。不像其他食物来源需要占用耕地,微藻可以使用非

饮用水、废水,甚至盐水培养;其另一个优点是单位面积的产量高^[4]。微藻具有丰富的生物多样性,目前发现的微藻种类约有5万种,是巨大的资源宝库^[5]。节旋藻是重要的微藻之一,属于蓝藻门、蓝藻

收稿日期:2022-01-15; 修回日期:2022-03-15

基金项目:国家自然科学基金(32060217);内蒙古自治区自然科学基金(2021MS08090);内蒙古科技计划(2019GG160); 第十一批“草原英才”工程,内蒙古道地蒙药材免疫活性多糖制备及其构效关系研究创新人才团队;内蒙古医科大学“三位一体”大学生创新创业培育项目(SWYT2020035)

第一作者:张竞男(1994-),女,2019级在读硕士研究生。E-mail: 84912472@qq.com

*通信作者:扈瑞平,女,博士,教授,硕士研究生导师。研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail: 783674348@qq.com

纲、颤藻科^[6],其中常见的商业化藻种是钝顶节旋藻和极大节旋藻(市场中的产品通常被称为螺旋藻)。

藻类的产业化与种质资源保护离不开对物种的分类学研究^[7],依据形态学特征来进行藻类分类的方法,往往存在形态上难以区分但在遗传上已经发生显著分化的情况^[8]。而且,基于形态的藻种鉴定对分类学专业知识依赖度高,需要经过多年实践才能掌握分类方法,且存在无法规避的主观判断偏差。随着现代分子生物学技术发展,分子标记作为藻类分类的方法已被广泛应用,分子标记是通过获取一段或多段基因序列并比对分析来进行鉴定,具有高效、可靠、易于标准化的优点^[9-11]。鉴定蓝藻门藻类常用的序列有16S rRNA^[12],ITS^[13],cpeBA-IGS^[14]。ITS序列即内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer)序列,在原核生物中按编码核糖体的3种rRNA即5S rRNA,16S rRNA,23S rRNA的基因顺序排列在一条DNA链上,序列差异度高,突变速率较16S rRNA快,广泛应用于揭示属间、属内种间以及较近的族间等蓝藻较低分类阶元上的发育关系^[15]。

1995年内蒙古农业大学乔辰教授在鄂尔多斯市巴彦淖尔碱湖发现了4种微藻,其中钝顶节旋藻、方胞节旋藻为中国新纪录种,鄂尔多斯节旋藻、巴彦淖尔螺旋藻为两种新种^[16]。鄂尔多斯市鄂托克旗螺旋藻产业园自2003年建设以来飞速发展,是我国最大的螺旋藻产业基地,2021年鄂托克旗螺旋藻进入了中欧地理标志互认产品目录。鄂尔多斯市委政府和鄂托克旗委政府将螺旋藻生产纳入“十四五”远景目标发展纲要,而产业化发展离不开基础研究的支撑。对鄂尔多斯地区节旋藻的系统性分子生物学鉴定少有报道。课题组也首次在呼和浩特市哈素海发现节旋藻种。本研究以ITS序列为分子标记对鄂尔多斯市巴彦淖尔碱湖的钝顶节旋藻、鄂尔多斯节旋藻、方胞节旋藻进行分类鉴定,并与采于哈素海和获赠于中国海洋大学的钝顶节旋藻做系统发育分析,为鄂尔多斯地区节旋藻种质资源开发与保护提供基因组数据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于2020年7月赴内蒙古自治区鄂尔多斯市巴彦淖尔碱湖采样,保存于离心管中带回实验室进行藻种分离。分离纯化得到钝顶节旋藻、鄂尔多斯节旋藻、方胞节旋藻。于2020年8月赴内蒙古自

治区呼和浩特市哈素海采样,分离纯化得到钝顶节旋藻。实验室保藏有一株获赠于中国海洋大学的钝顶节旋藻。5种藻的来源和标记如表1所示。纯化的5种藻均在Zarrouk培养基中培养,并用光学显微镜在40倍放大倍数下观察记录形态。收集鲜藻,经洗涤,戊二醛固定,脱水干燥,真空喷金,放置在扫描电镜内拍摄超微结构,在放大1700倍下拍摄藻末端照片,在放大8000倍下拍摄藻体照片。

表1 5种藻的来源与标记
Tab.1 Sources and markers of five species of algae

品种	来源	标记
钝顶节旋藻	呼和浩特市,哈素海	sp.HS
钝顶节旋藻	鄂尔多斯市,巴彦淖尔碱湖	sp.DD
钝顶节旋藻	青岛市,中国海洋大学	sp.QD
鄂尔多斯节旋藻	鄂尔多斯市,巴彦淖尔碱湖	sp.ER
方胞节旋藻	鄂尔多斯市,巴彦淖尔碱湖	sp.FB

1.2 主要试剂与仪器

植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化有限公司),Invitrogen琼脂糖(美国Thermo Fisher Scientific公司),2×Taq Master Mix(Novoprotein科技有限公司),DNA Marker III(天根生化有限公司),GoldView I型核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司)。基因扩增仪A300(杭州朗基科学仪器有限公司),凝胶成像系统ChampGel5000(北京赛智创业科技有限公司),SU8000场发射扫描电镜(日本日立公司)。

1.3 提取基因组DNA

以12000 r/min,4℃,离心5 min收集鲜藻沉淀于EP管中,用无菌去离子水12000 r/min,4℃,离心5 min,洗涤2次。向EP管中加入适量液氮,使用研磨棒充分研磨,之后按照植物基因组DNA提取试剂盒说明分别提取5种藻的基因组DNA,-20℃保存,用于后续检测。

1.4 PCR扩增

以5种藻的基因组DNA为模板扩增ITS序列片段。扩增ITS序列的引物参照李勇勇^[17]设计的上游引物FP(5'-TGYGGCTGGATCACCTCCTT-3')和下游引物RP(5'-TCTGTGTGCCTAGGTATCCACCGTT-3')。24 μL的反应体系中包含9.5 μL无酶水,12.5 μL 2×TaqMasterMix,上下游引物各0.5 μL,1 μL基因组DNA作为模板。反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 1 min,72℃ 2 min,共30个循环;72℃ 8 min。

PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪紫外灯照射下观察条带结果,确认扩增出ITS序列。

1.5 序列测定与分析

将PCR产物送至青岛睿博兴科生物技术有限公司测序。登录美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)网站,利用BLAST工具将测序结果与GenBank中注册基因序列进行同源性比对;利用MEGA7.0软件极大似然法构建系统发育树,并通过1000个Bootstrap重复来评估树的稳定性。

2 结果

2.1 形态学鉴定

使用光学显微镜拍摄的5种藻的形态如图1所示。sp.HS、sp.DD、sp.QD藻体为蓝绿色,螺旋形,接近末端处螺宽变小;sp.ER藻体呈蓝绿色,螺旋形,藻丝整体粗细一致,细胞宽度较大;sp.FB藻体呈蓝绿色,波浪形,藻丝整体粗细一致。使用扫描电镜拍摄的5种藻的特征如图2所示。5种藻的藻体末端呈半圆或钝圆形,横壁有缢缩。与乔辰等^[6]的结果一致。

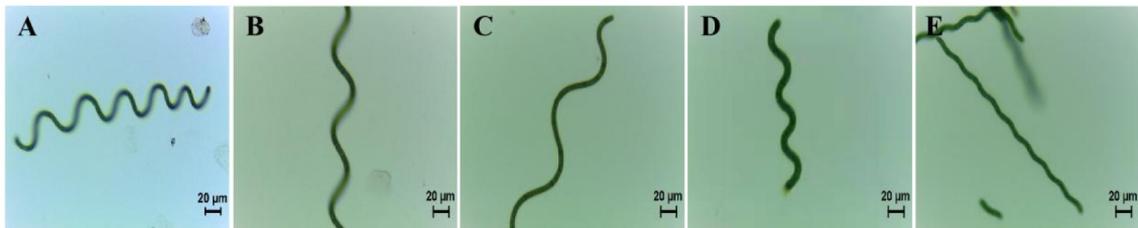


图1 5种藻的光镜照片

Fig.1 Light microscope photos of five species of algae

注:A:sp.HS;B:sp.DD;C:sp.QD;D:sp.ER;E:sp.FB。

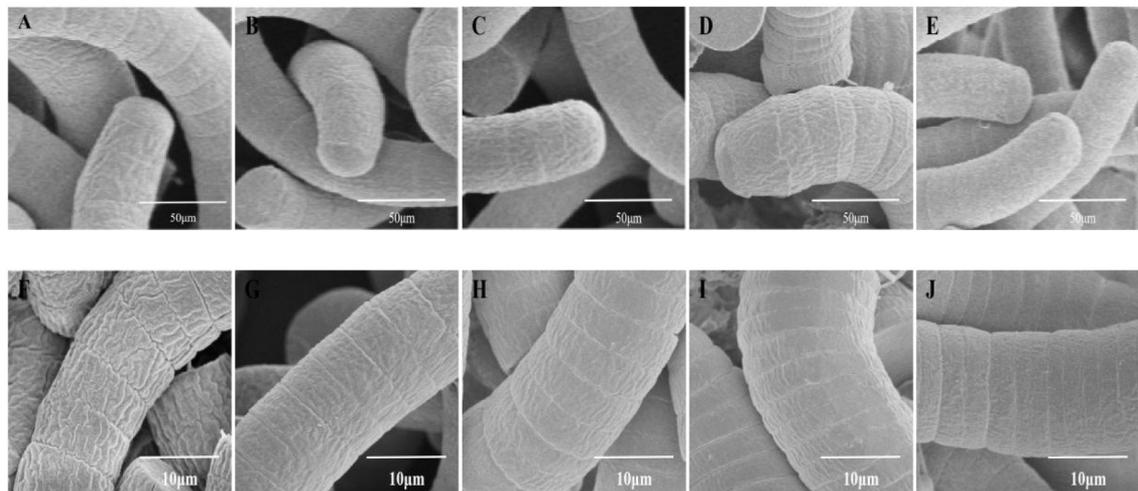


图2 5种藻的扫描电镜照片

Fig.2 SEM photos of five species of algae

注:A和F:sp.HS;B和G:sp.DD;C和H:sp.QD;D和I:sp.ER;E和J:sp.FB。

2.2 ITS序列分析

PCR产物琼脂糖电泳结果如图3所示。测序获得5种藻的ITS基因序列,序列长度由488 bp至501 bp。在GenBank数据库比对后可知,sp.HS、sp.DD、sp.QD分别与*Arthrospira platensis* strain Sp-2(DQ279768.1)、*Arthrospira platensis* “Inner Mongolia”(JN831263.1)、*Arthrospira platensis* F3S(KC195865.1)相似度最高,同源性为99.59%、88.01%、99.60%;sp.ER、sp.FB均

与*Arthrospira erdosensis* “Inner Mongolia”(JN831261.1)相似度最高,同源性均为99.18%。系统发育树如图4所示,sp.HS与*Arthrospira platensis* Sp-2在一个分支上,亲缘接近;sp.QD与*Arthrospira platensis* F3S在一个分支上,亲缘关系接近;sp.DD单独成为一支,sp.HS、sp.QD在sp.DD发出的两支上;sp.ER、sp.FB聚为一支,然后与*Arthrospira erdosensis* “Inner Mongolia”聚在一支,亲缘关系较近。

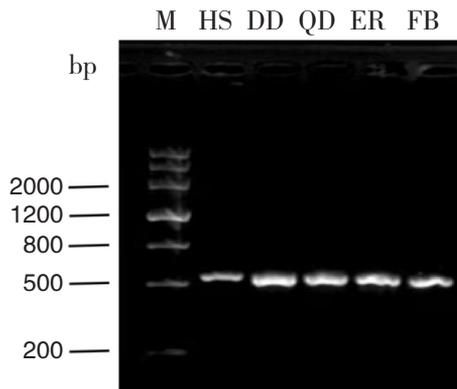


图3 PCR产物琼脂糖电泳结果

Fig.3 Agarose electrophoresis results of PCR products

注:自左至右依次为Marker、sp.HS、sp.DD、sp.QD、sp.ER、sp.FB。

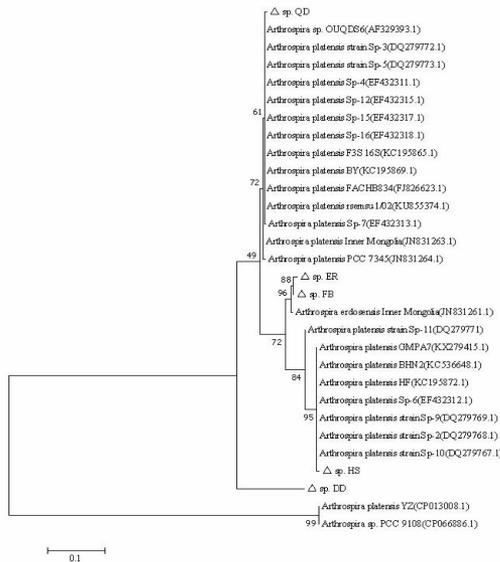


图4 ITS序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on ITS sequence

3 讨论

微藻广泛分布于各类水体中,种类多样,不仅可以作为生物能源,还具有很高的药用价值。为了实现培养优化和环保应用需要,首先必须对微藻进行科学筛选和分类^[18]。微藻分离与鉴定是开展微藻生物资源采集和保存的难点所在。传统分类方法主要依据微藻形态、大小、生理等特征,但在不同生长条件和不同生长阶段,微藻的形态学特征会发生变化,大大增加了技术人员对微藻分类鉴定的难度,难以制定统一正确的判断标准。本研究中除sp. FB为波浪形,其余4种藻均为螺旋形,电镜下的超微结构也无法将螺旋形的4种藻区分。传统的分类方法对于形态近似的藻种受到限制,而且无法反映物种之间的亲缘关系。

分子生物学技术逐渐引入微藻分类中,在基因水平的分类研究中,核糖体基因功能同源且古老,既含有保守区又含有可变区,且具有高度重复序列,可作为微藻分类的分子标志。ITS序列大小约500 bp,分子大小适宜操作,种间差异较大,适宜不同种间的分类,广泛应用于微藻分类学研究^[19]。本研究中通过扩增ITS序列鉴别出sp. HS与*Arthrospira platensis strain Sp-2*亲缘较近,同源性99.59%;sp. DD与*Arthrospira platensis*“Inner Mongolia”亲缘较近,同源性88.01%;sp. QD与*Arthrospira platensis* F3S亲缘较近,同源性为99.60%;但sp. ER和sp. FB均与*Arthrospira erdosensis*“Inner Mongolia”有99.18%的同源性,未能将形态学不同的彼此鉴别开,可能是两种藻在长期相同的生态环境下生长进化的缘故。系统发育进化树显示sp. ER和sp. FB聚为一支,亲缘关系最近,sp. HS与sp. QD分别位于sp. DD发出的两个进化支上,亲缘关系较远。Gonzalez等对从沙漠中分离的颤藻目藻株进行鉴定,发现16S rRNA和ITS结果与形态、生理生态的结果不完全匹配^[20]。由此得出藻类的进化与生态环境密切相关。分子生物学鉴定方法成为藻类鉴定的主流方法,弥补形态学鉴定无法提供藻种系统发育和进化关系的不足,但是仅依靠基因序列来鉴定也存在局限性。微藻品种繁多,类群复杂,为适应不同的生境可发生进化,加大了分类学研究的难度。所以,藻种的鉴定需结合形态特征与遗传信息甚至生理生化等特点,多方面多角度分析得出准确的结果。

实现微藻生物资源利用,需要有足够而且能持续及时提供的特异藻种种质资源,需要不断发掘、分离、鉴定自然界中的各种微藻种质资源^[21]。我国微藻种质资源的研究较国外起步较晚,微藻生物资源利用不充分,尤其对具有经济开发价值的种质资源的研究远远不足。鄂尔多斯沙区是我国著名的盐碱湖密集区,光照充足,为节旋藻生长提供了得天独厚的天然条件。经研究,鄂尔多斯市巴彦淖尔碱湖钝顶节旋藻生长的温度范围为6℃~40℃,最适生长温度为24℃,是天然的耐低温、广温型藻种^[16],为我国北方地区开展螺(节)旋藻产业化生产天然优势藻种,打破钝顶节旋藻在热带、亚热带地区生长的禁锢,丰富了鄂尔多斯地区微藻种质资源,为鄂尔多斯地区螺(节)旋藻产业发展提供基础条件,促进区域经济发展。同时也扩充了我国微藻种质资源,促进我国微藻规模化和产业化快速发展。

本研究对内蒙古鄂尔多斯地区节旋藻进行鉴定并做了系统发育分析,揭示了鄂尔多斯地区节旋藻物种多样性和遗传关系,为开发鄂尔多斯地区节旋藻种质资源,实现种质资源保护及鄂尔多斯地区螺(节)旋藻产业化发展打下基础。

参考文献

- [1]Batistaa AP, Nicolaib A, Fradinhoa P, et al. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility[J]. *Algal Res*, 2017, **26**(2): 161-171
- [2]Liber JA, Bryson AE, Bonito G, et al. Harvesting microalgae for food and energy products[J]. *Small Methods*, 2020, **4**(10): e2000349
- [3]Garcia JL, Vicente MD, Galan B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals[J]. *Microb Biotechnol*, 2017, **10**(5): 1017-1024
- [4]Torres TY, Fields FJ, Mayfield SP. Microalgae as a future food source[J]. *Biotechnol Advances*, 2020, **41**(96): e107536
- [5]宋立荣,张琪,郑凌凌,等. 微藻种质资源库——藻类科学研究和产业发展的重要平台[J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(5): 1020-1027
- [6]胡鸿钧,魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态[M]. 北京:科学出版社,2006
- [7]张军毅,孙蓓丽,朱冰川,等. 基于分子标记的藻类鉴定研究进展[J]. *湖泊科学*, 2021, **33**(6): 1607-1625
- [8]李小闯. 丝状蓝藻拟柱孢藻、尖头藻和拟圆孢藻的分类学和分子多样性研究[D]. 北京:中国科学院大学,2016
- [9]Manoylov KM. Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment[J]. *J Phycol*, 2014, **50**(3): 409-424
- [10]Kim K, Park C, Yoon Y, et al. Harmful cyanobacterial material production in the north han river (South Korea): genetic potential and temperature-dependent properties[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, **5**(3): 444
- [11]Jiang Y, Xiao P, Liu Y, et al. Targeted deep sequencing reveals high diversity and variable dominance of bloom-forming cyanobacteria in eutrophic lakes[J]. *Harmful Algae*, 2017, **64**(2): 42-50
- [12]Choi GG, Ahn CY, Oh HM. Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA-IGS* sequences[J]. *Algae*, 2012, **27**(2): 559-562
- [13]Krienitz L, Dadheech PK, Kotut K. Mass developments of a small sized ecotype of *arthrospira fusiformis* in lake oloidien, kenya, a new feeding ground for lesser flamingos in east africa[J]. *J Czech Phycol Society*, 2013, **13**(2): 215-225
- [14]Papapanagiotou G, Gkelis S. Taxonomic revision of commercially used *Arthrospira* (Cyanobacteria) strains: a polyphasic approach[J]. *Eur J Phycol*, 2019, **54**(4): 595-608
- [15]古扎丽阿依·牙生. 5株沙漠蓝藻的系统发育分析及微囊藻毒素基因同源性分析[D]. 乌鲁木齐:新疆师范大学,2019
- [16]乔辰,李博生,曾昭琪. 鄂尔多斯沙区碱湖与螺旋藻资源[J]. *干旱区资源与环境*, 2001, **22**(4): 86-91
- [17]李勇勇. 钝顶节旋藻 16S rRNA-ITS 分子鉴定及重金属 Pb²⁺对节旋藻影响研究[D]. 曲阜:曲阜师范大学,2013
- [18]李文涛,张红兵,李会宣,等. 微藻的筛选及分类方法[J]. *安徽农学通报*, 2020, **26**(5): 26-28+40
- [19]Tragin M, Zingone A, Vaulot D. Comparison of coastal phytoplankton composition estimated from the V4 and V9 regions of the 18S rRNA gene with a focus on photosynthetic groups and especially Chlorophyta[J]. *Environ Microbiol*, 2018, **20**(2): 506-520
- [20]Gonzalez RL, Johansen JR, Leon TH, et al. A bridge too far in naming species: a total evidence approach does not support recognition of four species in *Desertifilum* (Cyanobacteria)[J]. *J Phycol*, 2019, **55**(6): 898-911
- [21]蔡卓平,李燕璇,段舜山,等. 微藻种质资源的采集及保存现状[J]. *生态科学*, 2014, **33**(2): 396-400
- [10]Barrows IR, Ramezani A, Raj DS. Inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension—partners in crime[J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2019, **26**(2): 122-130
- [11]Marika, Massaro, Egeria, et al. Oxidative stress and vascular stiffness in hypertension: a renewed interest for antioxidant therapies[J]. *Vascular Pharmacology*, 2019, **15**(3): 23-25
- [12]Kristien, Daenen, Asmin, et al. Oxidative stress in chronic kidney disease[J]. *Pediatric Nephrology*, 2019, **22**(6): 12-14
- [13]Negi CK, Jena G. Nrf2, a novel molecular target to reduce type 1 diabetes associated secondary complications: the basic considerations[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, **84**(3): 12-26
- [14]Favilli F, Marraccini P, Iantomasi T, et al. Effect of orally administered glutathione on glutathione levels in some organs of rats: role of specific transporters[J]. *British Journal of Nutrition*, 1997, **78**(2): 293-300
- [15]Hagen TM, Wierzbicka GT, Bowman BB, et al. Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract[J]. *American Journal of Physiology*, 1990, **259**(1): 530-535
- [16]马来酸依那普利片药品说明书[DB/OL]. (2005-05-03) [2022-03-10]
- [17]Wenzel UO, Wolf G, Jacob I, et al. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003, **18**(10): 2005-2013
- [18]Vilhena JC, Melo LL, Jorge TM, et al. Reverses adverse cardiovascular remodeling in renovascular hypertension: a comparative effect with enalapril[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2021, **77**(5): 673-684

(上接第 117 页)