



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119242552 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 03

(21) 申请号 202411773906.7

C12Q 1/24 (2006.01)

(22) 申请日 2024.12.05

C12R 1/89 (2006.01)

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号南昌大学前湖校区

(72) 发明人 邵盛熙 余春丽 张雨琴 冯宇驰
周文广 陈赞旭 彭璇宾

(74) 专利代理机构 北京知艺互联知识产权代理有限公司 16137

专利代理师 赵荣

(51) Int. Cl.

C12N 1/36 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

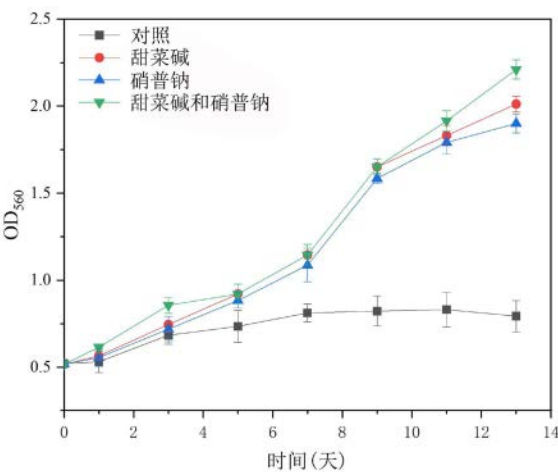
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法

(57) 摘要

本发明涉及微藻育种技术领域,并公开了外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,包括以下步骤:选用微藻作为初始育种材料;准备含有低浓度外源渗透调节剂分子的培养基;将微藻接种至培养基中,在适宜条件下进行培养,培养过程中,逐步增加盐胁迫压力,促进微藻的适应性进化;筛选耐盐性藻种;通过多次传代和筛选,获得纯度高、耐盐性强的微藻新品种。本发明采用上述的外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,通过外源渗透调节分子的辅助,进行微藻抗盐胁迫适应性进化育种,显著提高了微藻的耐盐性,同时缩短了育种周期,提高了育种效率,为耐盐新品种微藻的开发奠定基础。



1. 外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤a、选择初始育种材料:选用微藻作为初始育种材料,确保藻种来源清晰、纯度高;

步骤b、准备培养基:培养基含有低浓度外源渗透调节剂分子,其中外源渗透调节剂分子包括甜菜碱和/或硝普钠;

步骤c、接种与培养:将步骤a中选取的微藻接种至步骤b中的培养基中,在适宜条件下进行培养2-4周,确保藻种能够正常生长和繁殖;

步骤d、盐胁迫压力递增:培养过程中,随着微藻的生长和对外源渗透调节剂分子的消耗,对胁迫敏感的微藻细胞逐步被淘汰,耐受性强的微藻细胞逐渐富集扩增,每隔2周至3周,取旧培养液重新接种至新培养基,并逐步提升新培养基中的盐度,增加盐胁迫压力,促进微藻的适应性进化;

步骤e、筛选耐盐性藻种:观察并记录微藻在盐胁迫下的生长情况,以生物量OD值、生长速率和叶绿素含量作为筛选标准,达到筛选标准后,选取生长良好、耐盐性强的藻种作为候选耐盐藻种;

步骤f、藻种纯化:对步骤e中筛选出的候选耐盐藻种进行纯化,通过多次传代和筛选,获得纯度高、耐盐性强的微藻新品种。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤b中,培养基包括50-200 μ M的甜菜碱或25-100 μ M的硝普钠或50-200 μ M的甜菜碱和25-100 μ M的硝普钠。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤c中,微藻包括淡水螺旋藻、小球藻、雨生红球藻;淡水螺旋藻的培养温度为25-30 $^{\circ}$ C,光照强度3000-6000 lux,pH 8.5-11.5;小球藻的培养温度为20-25 $^{\circ}$ C,光照强度5000-10000 lux,pH 6.5-8.0;雨生红球藻的培养温度为22-28 $^{\circ}$ C,光照强度4000-8000 lux,pH7.0-8.5。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤d中,最高盐度为30-35 g/L,每次增加5-10 g/L盐度。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤e中,筛选标准还包括生长速率、叶绿素含量,通过显微镜观察、光谱分析进行检测和测量。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤f中,藻种纯化的过程通过梯度稀释、平板分离、单细胞操作的技术实现;将候选耐盐藻种在适宜条件下进行传代培养或者进行保种保藏,然后通过分子生物学技术,对传代后的藻种进行全基因组测序分析,确保纯化后的藻种完成了培养分离。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,纯化后藻种的单核苷酸多态性SNP位点大于95%的数量与驯化前野生型纯种的单核苷酸多态性SNP水平一致。

8. 如权利要求1-7任一项所述的方法,在筛选耐盐微藻新品种中的应用。

外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微藻育种技术领域,尤其是涉及外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法。

背景技术

[0002] 微藻作为一类具有高效光合作用能力的微生物,其在食品、美妆和医药等多个行业的应用价值日益凸显。传统微藻培养方法主要依赖于淡水资源,这不仅增加了培养成本,还可能受到水资源短缺和生物污染的困扰。利用海水配置培养基开展微藻培养可以显著降低培养成本,并减少淡水资源的消耗。然而,海水中的高盐度对微藻的生长和代谢构成了严重的胁迫,限制了其在海水环境中的直接应用。因此,驯化螺旋藻、小球藻、雨生红球藻等淡水新食品资源藻种以耐受更高的盐度,对于推进藻类产业的可持续发展具有重要意义。

[0003] 传统的适应性筛选方法,如自然选择和逐步适应法,虽然能够在一定程度上提高微藻的耐盐性,但往往周期长、效率低,难以满足快速选育新品种的需求。此外,诱变育种虽然能够通过物理或化学方法引入随机突变,但突变体的稳定性和遗传风险难以控制,且筛选过程繁琐。这些方法涉及长时间的驯化和适应,且筛选出的藻种常含不利变异,需进一步纯化。然而,纯化选择过程亦充满挑战,它需要在庞大的藻株群体中精准筛选出具有稳定耐盐性的优良藻种,这一过程不仅耗时耗力,而且结果易受环境条件波动的影响。

[0004] 为了克服上述方法的局限性,本发明提出了一种外源渗透调节分子辅助微藻耐盐胁迫的适应性进化育种方法。该方法在候选藻种尚未产生足够抗性时,通过添加外源甜菜碱和一氧化氮等渗透调节分子,短期内提升其盐抗性,从而增加其发生并累积足够突变的概率。这种方法的优势在于结合了外源分子的快速调控作用和适应性进化的长期累积效应,能够实现基于适应性进化的高效筛选育种,为微藻耐盐新品种的培育提供新的思路和方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,通过外源渗透调节分子的辅助,进行微藻抗盐胁迫适应性进化育种,显著提高了微藻的耐盐性,同时缩短了育种周期,提高了育种效率,为耐盐新品种微藻的开发奠定基础。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,包括以下步骤:

- a、选择初始育种材料:选用微藻作为初始育种材料,确保藻种来源清晰、纯度高;
- b、准备培养基:培养基含有低浓度外源渗透调节剂分子,其中外源渗透调节剂分子包括甜菜碱和/或硝普钠;
- c、接种与培养:将步骤a中选取的微藻接种至步骤b中的培养基中,在适宜条件下进行培养2-4周,确保藻种能够正常生长和繁殖;
- d、盐胁迫压力递增:培养过程中,随着微藻的生长和对外源渗透调节剂分子的消

耗,对胁迫敏感的微藻细胞逐步被淘汰,耐受性强的微藻细胞逐渐富集扩增,每隔2-3周,取旧培养液重新接种至新培养基,并逐步提升新培养基中的盐度,增加盐胁迫压力,促进微藻的适应性进化;

e、筛选耐盐性藻种:观察并记录微藻在盐胁迫下的生长情况,以生物量OD值、生长速率和叶绿素含量作为筛选标准,达到筛选标准后,选取生长良好、耐盐性强的藻种作为候选耐盐藻种;

f、藻种纯化:对步骤e中筛选出的候选耐盐藻种进行纯化,通过多次传代和筛选,确保纯化后藻种的SNP突变率大于95%的数量接近原始藻种的数量,获得纯度高、耐盐性强的微藻新品种。

[0007] 进一步地,步骤b中,培养基包括50-200 μ M的甜菜碱或25-100 μ M的硝普钠或50-200 μ M的甜菜碱和25-100 μ M的硝普钠。

[0008] 进一步地,步骤c中,微藻包括淡水螺旋藻、小球藻、雨生红球藻;淡水螺旋藻的培养温度为25-30 $^{\circ}$ C,光照强度3000-6000 lux,pH 8.5-11.5;小球藻的培养温度为20-25 $^{\circ}$ C,光照强度5000-10000 lux,pH 6.5-8.0;雨生红球藻的培养温度为22-28 $^{\circ}$ C,光照强度4000-8000 lux,pH7.0-8.5。

[0009] 进一步地,步骤d中,最高盐度为30-35 g/L,每次增加5-10 g/L盐度。

[0010] 进一步地,步骤e中,筛选标准还包括生长速率、叶绿素含量,通过显微镜观察、光谱分析进行检测和测量。

[0011] 进一步地,步骤f中,藻种纯化的过程通过梯度稀释、平板分离、单细胞操作的技术实现;将候选耐盐藻种在适宜条件下进行传代培养或者进行保种保藏,然后通过分子生物学技术,对传代后的藻种进行全基因组测序分析,确保纯化后的藻种完成了培养分离。

[0012] 进一步地,纯化后藻种的单核苷酸多态性(SNP)位点数量接近驯化前野生型纯种的单核苷酸多态性(SNP)水平,符合要求。

[0013] 本发明还提供了上述方法在筛选耐盐微藻新品种中的应用。

[0014] 本发明所述的外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法的优点和积极效果是:

1、本发明通过添加外源甜菜碱和一氧化氮等渗透调节分子,短期内提升其盐抗性,从而增加其发生并累积足够突变的概率。这种方法结合了外源分子的快速调控作用和适应性进化的长期累积效应,能够实现基于适应性进化的高效筛选育种,为微藻耐盐新品种的培育提供新的思路和方法。

[0015] 2、本发明通过外源渗透调节分子的辅助,实现了微藻抗盐胁迫适应性进化育种,显著提高了微藻的耐盐性,缩短了育种周期,提高了育种效率。同时筛选出的新品种在高盐环境下具有更好的生长性能和生物量积累能力,为微藻在盐碱地等环境的应用提供了新的解决方案。

[0016] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

[0017] 图1为本发明实施例中淡水螺旋藻的OD₅₆₀值。

具体实施方式

[0018] 以下通过附图和实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

[0019] 除非另外定义,本发明使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域内具有一般技能的人士所理解的通常意义。

[0020] 除非另外定义,本发明使用的仪器、设备、试剂均为常规市售。

[0021] 步骤1,初始育种材料选择:选用淡水螺旋藻、小球藻、雨生红球藻作为初始育种材料,确保藻种来源清晰、纯度高。

[0022] 步骤2,培养基准备:准备含有低浓度外源渗透调节剂分子的培养基,其中外源渗透调节剂分子为甜菜碱和/或硝普钠(一氧化氮供体)。甜菜碱的浓度范围设定为50至200 μ M,硝普钠的浓度范围设定为25至100 μ M,确保培养基中渗透调节剂分子浓度的准确性。调整培养基的pH值至8.5-11.5,光照强度设定为4000-6000 lux,温度控制在25-30 $^{\circ}$ C。

[0023] 步骤3,接种与培养:将步骤1中选取的微藻接种至步骤2中的培养基上,在适宜的温度、光照、pH等条件下进行培养,确保藻种能够正常生长和繁殖。具体培养条件根据藻种不同而有所差异,淡水螺旋藻的培养温度为25-30 $^{\circ}$ C,光照强度3000-6000 lux,pH 8.5-11.5;淡水小球藻的培养温度为20-25 $^{\circ}$ C,光照强度5000-10000 lux,pH 6.5-8.0;淡水雨生红球藻的培养温度为22-28 $^{\circ}$ C,光照强度4000-8000 lux,pH 7.0-8.5。

[0024] 步骤4,盐胁迫压力递增:在培养过程中,随着微藻的生长和对外源渗透调节剂分子的消耗,逐步增加盐胁迫压力。通过逐渐增加培养基中的盐度,模拟自然环境中的盐度变化,促进微藻的适应性进化。盐度增加范围设定为0-(30-35) g/L,每次增加5 g/L氯化钠。

[0025] 步骤5,筛选耐盐性藻种:观察并记录微藻在盐胁迫下的生长情况,通过测定生物量OD₅₆₀值作为筛选标准,并结合其他生物学指标(如生长速率、叶绿素含量等)进行综合评估。在达到筛选标准(与野生型藻株指标相似)后,选取生长良好、耐盐性强的藻种作为候选耐盐藻种。

[0026] 步骤6,藻种纯化:对筛选出的候选耐盐藻种进行纯化,通过多次传代和筛选,结合分子生物学技术(如SNP分析、基因测序等)进行突变率检测,确保纯化后藻种的突变率符合要求(特有SNP数量达到原始藻种的70%以上),最终获得纯度高、耐盐性强的微藻新品种。

[0027] 实施例1

添加外源渗透调节分子甜菜碱至Zarrouk培养基进行培育淡水螺旋藻,逐步增加盐胁迫压力,从0 g/L,10 g/L,15 g/L,20 g/L,25 g/L增加至30 g/L氯化钠,同时每次向培养基中添加150 μ M的甜菜碱进行培养。藻细胞初始浓度控制在0.45 g/L,光照培养温度为28 $^{\circ}$ C,光照强度为5500 lux,进行通气培养。培养结束后,淡水螺旋藻的OD₅₆₀为2.01。

[0028] 实施例2

添加外源渗透调节分子硝普钠至Zarrouk培养基进行培育淡水螺旋藻,逐步增加盐胁迫压力,从0 g/L,10 g/L,15 g/L,20 g/L,25 g/L增加至30 g/L氯化钠,同时每次向培养基中添加50 μ M的硝普钠进行培养。藻细胞初始浓度控制在0.45 g/L,光照培养温度为28 $^{\circ}$ C,光照强度为5500 lux,进行通气培养。驯化培养结束后,淡水螺旋藻的OD₅₆₀达到了1.90。

[0029] 实施例3

添加外源渗透调节分子硝普钠至Zarrouk培养基进行培育淡水螺旋藻,逐步增加盐胁迫压力,从0 g/L,10 g/L,15 g/L,20 g/L,25 g/L增加至30 g/L氯化钠,同时每次向培

培养基中添加50 μM 的硝普钠进行培养。藻细胞初始浓度控制在0.45 g/L,光照培养温度为28 $^{\circ}\text{C}$,光照强度为5500 lux,进行通气培养。驯化培养结束后,淡水螺旋藻的 OD_{560} 达到了1.90。

[0030] 对比例1

采用常规培养方式(即不添加任何外源渗透调节分子至Zarrouk培养基)进行培育淡水螺旋藻,逐步增加盐胁迫压力,从0 g/L,10 g/L,15 g/L,20 g/L,25 g/L增加至30 g/L氯化钠。藻细胞初始浓度控制在0.45 g/L,光照培养温度为28 $^{\circ}\text{C}$,光照强度为5500 lux,进行通气培养。驯化培养结束后,淡水螺旋藻的 OD_{560} 达到了0.79。

[0031] 图1为实施例1、2、3和对比例1驯化培养后所获得耐盐的淡水螺旋藻在30 g/L氯化钠下的 OD_{560} 值变化,由图1可以看出,添加外源渗透调节分子可以调控微藻的适应性进化,与单独使用甜菜碱或硝普钠相比,甜菜碱和硝普钠综合使用进一步提升了淡水螺旋藻的耐盐性能。同时甜菜碱和硝普钠一起使用时的最佳使用条件为:150 μM 的甜菜碱和50 μM 的硝普钠。最佳耐盐螺旋藻在纯化后的SNP突变率大于95%的数量与原始藻种水平一致。

[0032] 因此,本发明采用上述的外源渗透调节分子辅助微藻抗盐胁迫适应性进化的方法,通过外源渗透调节分子的辅助,进行微藻抗盐胁迫适应性进化育种,显著提高了微藻的耐盐性,同时缩短了育种周期,提高了育种效率,为耐盐新品种微藻的开发奠定基础。

[0033] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其进行限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而这些修改或者等同替换亦不能使修改后的技术方案脱离本发明技术方案的精神和范围。

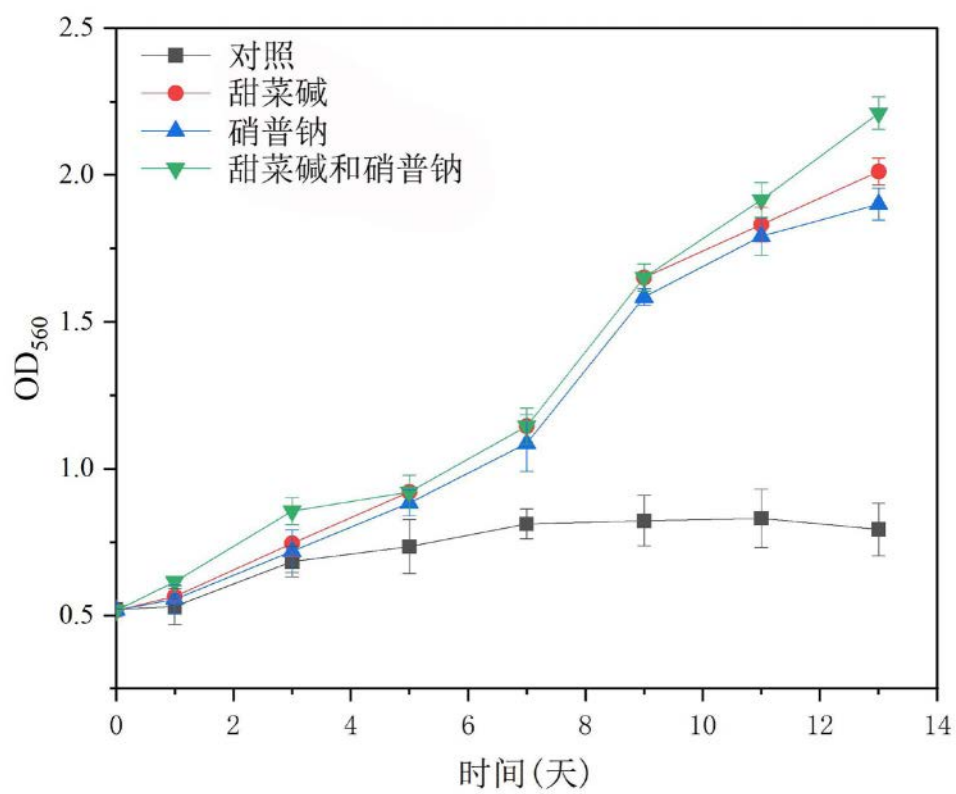


图 1