

# 光照与温度对紫外筛选盐生杜氏藻藻株的生长及色素积累的影响

孟 振<sup>1,2</sup>, 张学成<sup>2</sup>, 时艳侠<sup>2</sup>

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**利用紫外线诱变方法进行盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)的藻种选育,并研究了所选择的3株诱变株(OUC21, OUC36, OUC66)对光照和温度的反应。结果表明,光照实验中诱变株和出发株(BJ38)的生长与 $\beta$ -胡萝卜素积累的最适光照强度相同,都是 $0.88 \times 10^4$  lx,此光强下诱变株的生长速率要高于出发株,其中OUC36生长速率最快,藻细胞密度比出发株高25%;3株诱变株中只有OUC36单位体积藻液中 $\beta$ -胡萝卜素的积累量(10.76 mg/L)高于出发株(10.10 mg/L),而OUC21(6.68 mg/L)则低于出发株,各光强下3株诱变株单位体积藻液叶绿素的积累量都高于出发株。诱变株与出发株在最适生长温度上表现出差异性,出发株生长的最适温度为22℃,诱变株OUC66与之相同,而OUC21和OUC36生长的最适温度是28℃,实验中同一温度条件下诱变株的生长速率高于出发株,最大的也是OUC36;适于 $\beta$ -胡萝卜素积累的温度诱变株与出发株相同,都是22℃,3株诱变株中同样是OUC36单位体积藻液中 $\beta$ -胡萝卜素积累量(7.9 mg/L)最大,略高于BJ38(7.84 mg/L),而OUC21(5.31 mg/L)最低,各温度下诱变株单位体积藻液中叶绿素含量高于出发株。OUC36具有生长速率快和积累 $\beta$ -胡萝卜素能力强的优点,可能成为适用于大规模培养的藻种。

**关键词:**盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*);紫外线;诱变; $\beta$ -胡萝卜素

**中图分类号:**Q949.21

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-3096(2008)07-0020-10

杜氏藻(*Dunaliella*)属绿藻门(Chlorophyta),真绿藻纲(Chlorophyceae),衣藻目(Chlamydomonadales),杜氏藻科(Dunaliellaceae),现已有十几个种,且大多生活在富含NaCl的水中,如海洋、盐湖、盐池等处。盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)无细胞壁,仅有一层糖蛋白和神经氨酸组成的外膜包裹<sup>[1]</sup>,类似天然的原生质体,因此其藻体形态随生长条件不同有很大变化,如有卵圆形、球形、梨形、长颈形等不同的细胞形态。在人工控制和胁迫条件下能大量合成并积累 $\beta$ -胡萝卜素,可高达细胞干质量的10%~14%<sup>[2,3]</sup>,其中9-顺式异构体占很大一部分。又因其生长速度快,抗逆性强,是重要的微藻养殖物种,已在中国、澳大利亚和以色列等国家开展了大规模养殖。

$\beta$ -胡萝卜素是一种广泛存在于光合生物中的脂溶性光合色素,呈顺式和反式混合构型,摄入人体后裂解,一部分成为维生素A分子,另一部分具有猝灭体内对人体有害的自由基、抗衰老、防止癌变的生物学活性。 $\beta$ -胡萝卜素虽然分布很广,但一般含量极微,盐生杜氏藻作为重要的养殖物种, $\beta$ -胡萝卜素含量极其丰富,是生产 $\beta$ -胡萝卜素的最重要的天然资源。

目前国内外研究集中在寻找最优化工工艺条件及新型光生物反应器<sup>[1,4~12]</sup>或者通过基因工程方

法<sup>[13~18]</sup>以提高藻体密度或 $\beta$ -胡萝卜素产量。但由于盐生杜氏藻生物量的增加和 $\beta$ -胡萝卜素的积累是两个不同的生理过程,要同时实现高生物量、高 $\beta$ -胡萝卜素产量,优良藻株的选育是最佳、最经济的途径<sup>[19]</sup>。

紫外线是应用广泛的多功能物理诱变剂,在工业微生物领域取得了令人瞩目的成效<sup>[20~22]</sup>。原生质体诱变能使诱变率大为提高,且能提高正变株的变异幅度<sup>[23~26]</sup>。然而盐生杜氏藻作为天然的原生质体,利用此项技术进行藻种选育的报道却尚未见到。作者报道了利用紫外线诱变盐生杜氏藻及具有优良性状藻株的筛选研究结果,为筛选高生物量、高 $\beta$ -胡萝卜素产量的优良藻株提供实验基础和有效方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种

盐生杜氏藻由中国海洋大学生命学院藻类遗传

收稿日期:2005-10-11;修回日期:2006-03-10

基金项目:国家863计划项目(819-02-01)

作者简介:孟振(1981-),男,山东曲阜人,硕士研究生,研究方向为藻类生理和分子遗传学,E-mail:zhenm1981@163.com;张学成,通讯作者,E-mail:xczhang@ouc.edu.cn

室保种,本实验出发藻种 *D. salina* BJ38 为单克隆选育出的  $\beta$ -胡萝卜素含量比较高的株系。

## 1.2 培养基及培养条件

培养基为本实验室依据内蒙古兰太盐湖卤水(表1)优化的卤水培养基(饱和卤水+蒸馏水):盐度120;  $\text{NaNO}_3$  浓度为 0.4 mmol/L, 尿素浓度为 0.2 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度 0.1 mmol/L, 柠檬酸铁浓度 0.01 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  浓度 18 mmol/L。

表1 内蒙古兰太盐湖饱和卤水成分的质量浓度

Tab. 1 Ingredient of saturated brine from Lantai salt lake in Inner-Mongolia g/L

$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{K}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{Cl}^-$	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{HCO}_3^-$
0.56	11.22	0.30	105.67	7.38	190.08	0.054	0.13

藻种于 HPG-280B 光照培养箱内培养,光源为日光灯,光照强度为  $0.60 \times 10^4$  lx,温度为  $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,光暗周期为 12 h : 12 h。

## 1.3 紫外线诱变

### 1.3.1 紫外线处理

分别取对数生长期的藻液 5 mL 置于小的塑料培养皿内,在磁力搅拌下,用紫外灯(30 W,照射距离为 15 cm)进行不同时间的照射。

### 1.3.2 诱变后培养及突变株的筛选

照射后取全部藻液接种到装有 35 mL 培养基的 100 mL 三角烧瓶中,遮光 5 h 以避免光修复,再光照培养一段时间,待细胞恢复增殖能力后,经平板分离,挑取体积较大或者颜色较黄的单藻落 100 株于 100 mL 三角烧瓶中培养,在光强为  $0.6 \times 10^4$  lx,温度为  $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  条件下培养 14 d,经初步筛选(比较藻液密度,藻液颜色)出 18 株。这 18 株接种到 250 mL 三角瓶(藻液量为 150 mL),以出发藻种 BJ38 为对照,测定各株藻的生长速率和  $\beta$ -胡萝卜素积累量。

## 1.4 光照设置

在光照对诱变株系生长和色素积累影响的实验中,培养基同上,温度为  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,参照文献[2,3],将光照强度设定为 4 个梯度  $0.22 \times 10^4$ ,  $0.44 \times 10^4$ ,  $0.66 \times 10^4$ ,  $0.88 \times 10^4$  lx。实验设 3 个平行样,重复一次,测定其生长速率和色素含量。

## 1.5 温度设置

在温度对诱变株系生长和色素积累影响的实验中,培养基同上,光照强度为  $0.88 \times 10^4$  lx,温度设定

4 个梯度 15, 22, 28 和  $35^\circ\text{C}$ 。

实验同样设 3 个平行样,重复一次,测定其生长速率和色素含量。

## 1.6 生长速率的测定

以血球计数板在光学显微镜(Olympus)下直接计数盐藻细胞数量。计算 3 个平行样品的平均值。

## 1.7 叶绿素(a、b)的测定

取 5 mL 藻液,加入适量 90% 丙酮溶液充分振荡提取色素,重复 2~3 次,直至藻体成灰白色,合并各次提取液,定容至 25 mL,使用 UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计测其在 OD645、OD663 下的吸光值( $A_{645}$ ,  $A_{663}$ )。按 Jensen 公式<sup>[27]</sup>换算出相应的叶绿素含量。取 3 个样品的平均值。

$$c_{chl}(\text{mg/L}) = (8.02 \times A_{663} + 20.21 \times A_{645}) \times \text{定容体积/样品体积}$$

## 1.8 $\beta$ -胡萝卜素的测定方法

方法同上,测 OD450 处的吸光值  $A_{450}$ 。按 Jensen<sup>[27]</sup>介绍的公式求出相应的  $\beta$ -胡萝卜素含量。结果取 3 个样品的平均值。

$$c_{\beta}(\text{mg/L}) = A_{450} \times (10\ 000/2\ 500) \times \text{定容体积/样品体积}$$

# 2 实验结果

## 2.1 紫外线辐射后细胞的存活率及诱变时间的选择

紫外线辐射引起藻细胞形态结构的变化如下:藻细胞鞭毛脱落,细胞静止;一部分细胞色素体由绿色逐渐变浅,浓缩分裂成许多小块,直至色素体变白,整个细胞裂解;另外一部分细胞色素先变浅,24~48 h 后恢复到原来颜色,而且色素体清晰可见。

各实验组盐生杜氏藻细胞在辐射后 5 d 内存活率下降很快,5 d 以后存活率相对稳定,因此在辐射后第 5 天统计存活率(图 1)。由图 1 可见,试验中使用的各种紫外线辐射剂量对藻细胞都有致死作用,辐射距离为 15 cm,辐射时间 10~15 min,细胞死亡率变化最大,其相对死亡率增加近 1 倍,说明 15 min 时的辐射量是处于多数细胞的敏感区域与耐受极限。为了获得较多的突变型,又不至于因为辐射剂量过大造成大部分细胞都死亡而残留一些不活跃的细胞,作者选择辐射时间为 20 min。

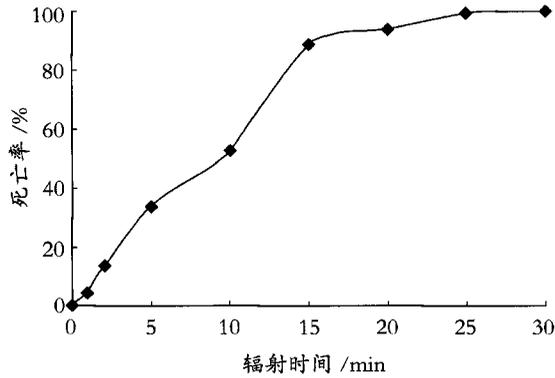


图1 紫外线辐射时间与死亡率的关系

Fig. 1 Relationship between irradiation time and mortality

## 2.2 诱变后优良藻株的选育

诱变后培养的藻株根据生长速度、藻液颜色、细胞活动性及形态,从100株藻中选出18株,与出发株在同一条件下培养14 d。通过测定藻细胞终密度可看出,11株藻的终细胞密度要显著大于出发株,其余的与出发株差异不大。密度最大的3株是 Mu36,

表2 正变异诱变株的筛选

Tab. 2 The selection of positive mutants

株系	藻细胞密度 ( $\times 10^4$ 个/mL)	$\beta$ 胡萝卜素质量浓度 (mg/L)	藻细胞 $\beta$ 胡萝卜素含量 (pg/个)	细胞形态	
				长径( $\mu$ m)	短径( $\mu$ m)
BJ38	79.38	5.54	6.98	13.80	11.46
Mu14	101.25*	4.26*	4.21	11.23	10.66
Mu21	117.50*	6.56*	5.58	11.88	9.50
Mu36	123.13*	7.13*	5.79	11.43	9.70
Mu37	87.50	5.26	6.01	12.33	11.25
Mu50	112.19*	6.03*	5.37	11.75	10.32
Mu55	99.38*	5.16	5.19	12.35	11.43
Mu56	104.38*	5.26	5.04	12.06	11.27
Mu57	112.50*	5.60	4.98	12.15	10.48
Mu58	99.69*	5.57	5.59	11.98	11.26
Mu59	108.13*	5.54	5.12	11.76	10.03
Mu63	88.24	6.34*	7.18	12.95	10.32
Mu66	127.50*	6.67*	5.23	11.13	9.31
Mu69	108.44*	6.05	5.58	11.52	9.87
Mu72	81.25	5.88	7.24	13.58	11.09
Mu74	81.88	5.32	6.48	13.05	11.12
Mu75	90.00	5.56	6.18	12.98	11.26
Mu76	69.06*	3.69*	5.34	13.41	11.33
Mu79	82.50	3.77*	4.57	13.13	10.85

注:表中数据为3个重复组平均数;\*表示差异显著( $P < 0.5$ )

Mu21 和 Mu66。在培养到第6天时 Mu21, Mu66 和 Mu72 的藻液开始变黄,这3株藻在最终测定的单位体积藻液中  $\beta$ -胡萝卜素质量浓度也比较高,分别达到6.56, 6.67, 5.88 mg/L,而单位体积藻液积累  $\beta$ -胡萝卜素最大的是 Mu36,质量浓度可达7.13 mg/L。进一步分析比较藻细胞中  $\beta$ -胡萝卜素含量可以发现,除去 Mu72 藻株外,剩余的株系藻细胞  $\beta$ -胡萝卜素含量都比出发株 BJ38(6.98 pg/个)有不同程度的减少(表2)。同时,诱变株系的藻细胞体积也比出发株要小,但在后续培养中这些变小的细胞又基本恢复到原始大小,推测可能是藻细胞为适应紫外伤害的一种自我调节。

作者选择藻细胞生长快、藻液  $\beta$ -胡萝卜素质量浓度高、藻细胞相对较大、活动良好的藻株进行后续实验,为此选定 Mu21, Mu36 和 Mu66,进一步分析诱变株与出发株、诱变株之间的差异,为便于分析将3株藻分别命名为 OUC21, OUC36, OUC66。

### 2.3 光照对 3 株诱变株系生长和色素积累的影响

#### 2.3.1 光照对 3 株诱变株系生长的影响

从表 3 可以看出,在同一温度(25℃±1℃)、同样的营养盐、不同的光照强度条件下进行的 16 组实验藻细胞密度的变化都呈现逐渐增加的趋势,而且在开始的 3 d 内变化都不明显,从第 4 天开始藻细胞密度明显增加。光强最大时(0.88×10<sup>4</sup> lx),4 个株系(BJ38, OUC21, OUC36, OUC66)终细胞密度都是最高的,其中 OUC36 藻细胞密度最高,达到 86.7×10<sup>4</sup> 个/mL,比出发株高 25%;而当光照强度为 0.22×10<sup>4</sup> lx 时,出发株及诱变株系藻细胞密度都是最低的,本实验中各藻株都大致表现出随光强的增大细胞终密度

升高的趋势。本实验所设定的光强没有出现光抑制的现象。

对应任一光强下,诱变株系与出发株之间在生长速率上表现出一定的差异,出发株的指数生长期相对较短,而终细胞密度也最低。同时相比于出发株,诱变株系对低光强的适应能力要更强。

诱变株系尽管生长最适光强都是 0.88×10<sup>4</sup> lx,但在光强的适应性上表现出一定的差异,在两个低光强下,3 株诱变株系终细胞密度相差不大,高于出发株。当光照强度为 0.88×10<sup>4</sup> lx 时,OUC66 终细胞密度低于另外两株,和出发藻种相当。高光强对 OUC21 表现出一定的抑制性,其藻细胞密度和出发株相当。

表 3 光照对 3 株诱变株系及出发株生长的影响

Tab. 3 The effect of light on growth of the initial strain and the selected three mutants

藻株	光强 (×10 <sup>4</sup> lx)	细胞密度(×10 <sup>4</sup> 个/mL)										
		时间(d)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BJ38	0.22	5.000	7.625	8.625	16.500	28.125	34.625	35.000	37.875	42.125	46.375	48.250
	0.44	5.000	8.375	11.125	18.250	25.375	28.875	37.625	42.625	48.625	55.625	56.500
	0.66	5.000	9.250	11.875	19.125	26.500	31.125	39.875	50.500	58.125	58.750	61.125
	0.88	5.000	7.375	10.500	17.125	30.875	38.750	42.125	55.625	60.125	63.250	69.125
OUC21	0.22	5.000	8.250	10.875	15.688	21.875	29.125	35.875	46.000	49.000	55.500	60.125
	0.44	5.000	8.125	12.750	18.500	28.250	40.375	43.625	51.750	57.375	59.000	63.625
	0.66	5.000	9.375	15.250	19.250	30.250	40.750	42.125	51.125	60.000	64.250	69.250
	0.88	5.000	8.375	12.250	24.125	39.750	43.000	50.625	61.125	63.250	66.000	71.875
OUC36	0.22	5.000	6.000	8.625	12.875	15.375	21.125	23.500	28.625	52.250	53.375	63.000
	0.44	5.000	7.375	9.000	12.375	16.500	26.375	30.625	39.875	55.875	58.125	65.625
	0.66	5.000	6.250	9.250	15.875	25.500	36.125	41.375	50.625	61.625	70.625	78.125
	0.88	5.000	8.250	10.125	17.375	28.000	39.125	49.625	70.250	78.625	80.750	86.625*
OUC66	0.22	5.000	5.250	7.375	8.750	14.000	15.750	27.875	38.000	41.625	45.125	62.250
	0.44	5.000	4.500	7.375	7.750	19.500	25.125	31.375	42.875	60.125	61.500	64.625
	0.66	5.000	5.635	10.250	13.375	22.250	29.000	33.500	35.875	51.125	60.125	63.125
	0.88	5.000	6.000	9.125	15.125	26.750	39.625	48.750	66.875	74.000	76.375	77.031

注:表中数据为三个重复组平均数;\*表示差异显著(P<0.5)

#### 2.3.2 光照对 3 株诱变株系色素积累的影响

从图 2 可看出,对于出发株和 3 株诱变株系,随着光照强度的增加,β-胡萝卜素积累量都不断增加,验证了高光强(0.88×10<sup>4</sup> lx)有利于 β-胡萝卜素的积累

这一结论。实验过程中还发现,在培养的前 7 d,β-胡萝卜素含量变化很小,而此时藻正处于指数生长期,

培养后期当  $\beta$ -胡萝卜素开始快速积累时,藻的生长处于相应的平台期,细胞密度的增加减慢。这从一个方面说明了盐生杜氏藻的生长和  $\beta$ -胡萝卜素的积累是两个不同的生理过程。

出发株和诱变株系之间,高光强下( $0.88 \times 10^4$  lx),诱变株 OUC36 单位体积藻液的  $\beta$ -胡萝卜素积累量最高,达到 10.76 mg/L,其次为出发株系 BJ38 (10.10 mg/L), OUC66 (9.5 mg/L) 和 OUC21 (6.68 mg/L) 相对较低。在不适于藻生长的两个低光条件下,出发株系积累  $\beta$ -胡萝卜素能力明显高于 3 个诱变株系。同一光强下,诱变株系 OUC21 的各实验组  $\beta$ -胡萝卜素积累量都是最小的,远低于出发株和诱变株 OUC36。藻细胞积累  $\beta$ -胡萝卜素的能力, BJ38 (14.61 pg/个) 则要明显高于 3 个诱变株系 (OUC21 为 9.29 pg/个, OUC36 为 12.42 pg/个, OUC66 为

11.72 pg/个)。这也与作者在筛选出发株系时得到的 BJ38 积累  $\beta$ -胡萝卜素能力比较强的结论一致。但 BJ38 生长速率不理想,工业化养殖中在考虑  $\beta$ -胡萝卜素含量的同时,更重要的还要考虑生物量。从所筛选的 3 株诱变株中可以看到 OUC36 具备生长速率快、单位体积藻液的  $\beta$ -胡萝卜素含量高(要略高于出发株)的特点,比出发株更有养殖潜力。

图 3 显示单位体积藻液叶绿素的积累随着光强的增加,积累量逐渐减少,考虑到低光强下藻细胞密度比较低,因此可以计算出低光强下藻细胞叶绿素含量更高,这一结论也和其他研究者得到的结论一致。另外对应任一光强下,3 个诱变株系单位体积藻液叶绿素的积累都要高于出发株,而 3 者中 OUC36 是最高的。

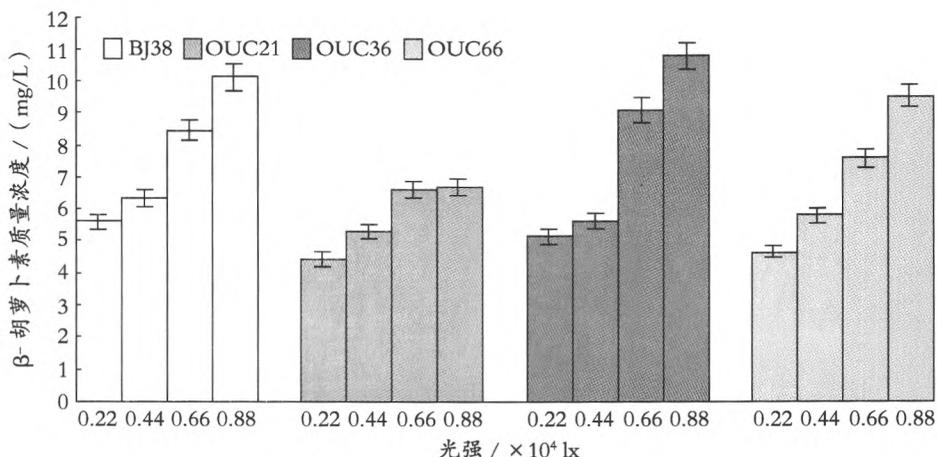


图 2 光照强度对出发株和 3 株诱变株系  $\beta$ -胡萝卜素积累的影响

Fig. 2 Effect of light intensity on accumulation of  $\beta$ -carotene of the initial strain and the selected three mutants

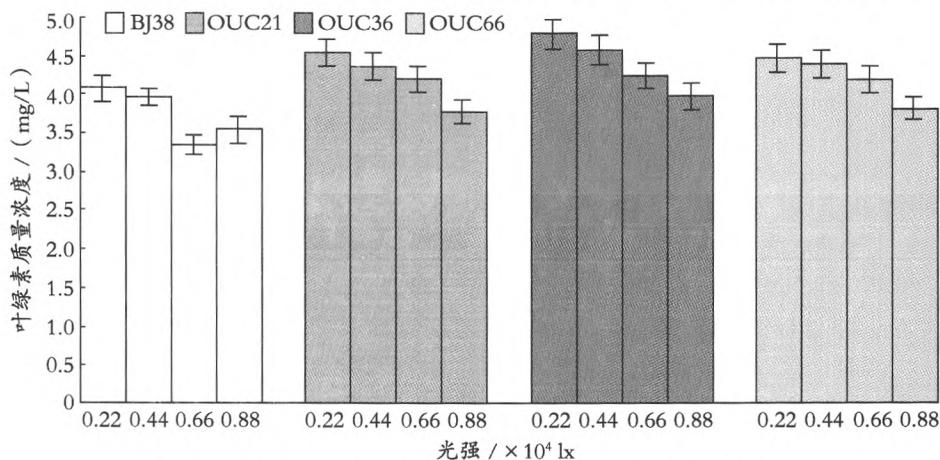


图 3 光照强度对出发株和 3 株诱变株系叶绿素积累的影响

Fig. 3 Effect of light intensity on accumulation of chlorophyll of the initial strain and the selected three mutants

## 2.4 温度对3株诱变株系生长和色素积累的影响

### 2.4.1 温度对3株诱变株系生长的影响

从表4可看出在设定的温度梯度中,3个诱变株系和出发株在最适温度条件下的细胞密度都比其在最高温度下高一倍多,而且也高于在最低温度下的细胞密度。28℃和35℃培养条件下,培养的前4,5 d内,藻细胞生长速率要高于另外两个温度下同期内细胞的生长速率,5 d之后,35℃下的4株藻的生长速率都不同程度地减慢。15℃下培养的4株藻生长情况则与35℃条件下的恰恰相反,它们在前5 d生长缓慢,甚者不生长,5 d之后才开始增长,这可能与杜氏藻适应低温变化有关。

3株诱变株系和出发株之间显示出不同的温度适应性,出发株(BJ38)、诱变株(OUC66)生长的最适温度为22℃,另外2株生长的最适温度则为28℃,相对来说,这2株(OUC21,OUC36)适应高温的能力也更强。在各组实验中,细胞密度最高的一组是OUC36/28(82.75×10<sup>4</sup>个/mL)实验组,这一点和光照实验得到的结论相似,即在最适条件下(本实验中OUC36生长的最适温度是28℃,出发株是22℃)诱变株OUC36终细胞密度(82.75×10<sup>4</sup>个/mL)要明显高于出发株(63.75×10<sup>4</sup>个/mL, P<0.5),而且比出发株在同一温度下(57.50×10<sup>4</sup>个/mL)高43.9%,同时高于另外两个诱变品系。温度实验中,3个诱变株系与出发株生长趋势最接近的一株是诱变株OUC66。

表4 温度对3株诱变株系及出发株生长的影响

Tab.4 The effect of temperature on growth of the initial strains and the selected three mutants

藻株	温度(℃)	细胞密度(×10 <sup>4</sup> 个/mL)										
		时间(d)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BJ38	15	5.000	4.625	4.375	4.750	6.500	11.750	16.375	22.125	27.250	35.125	47.625
	22	5.000	4.875	6.875	10.625	21.000	27.750	44.875	57.375	62.233	63.083	63.750
	28	5.000	6.000	11.125	19.625	23.625	30.000	41.375	46.750	51.583	53.500	57.500
	35	5.000	6.000	7.250	15.625	21.750	23.625	25.125	34.500	34.875	39.875	31.188
OUC21	15	5.000	4.375	4.500	5.375	6.000	6.875	10.500	21.250	25.625	28.375	42.063
	22	5.000	5.375	8.375	16.750	19.250	29.375	47.375	49.375	57.375	68.875	65.000
	28	5.000	5.750	10.750	16.000	39.000	41.500	53.375	67.875	72.458	74.500	77.513*
	35	5.000	9.125	9.375	18.625	21.625	32.125	37.625	42.625	45.625	47.875	49.438
OUC36	15	5.000	5.000	5.250	5.625	5.875	7.000	8.375	15.625	24.375	33.500	38.313
	22	5.000	5.625	6.125	9.750	15.125	25.625	29.500	35.875	58.875	65.375	71.750
	28	5.000	5.375	13.625	23.375	26.500	34.375	45.125	54.750	75.833	78.000	82.750*
	35	5.000	6.000	7.875	15.750	21.625	23.500	28.750	32.000	33.500	38.250	46.188
OUC66	15	5.000	4.625	4.875	5.375	5.750	9.625	13.250	13.375	21.375	34.250	33.250
	22	5.000	4.875	6.750	12.375	21.250	29.750	44.625	57.875	64.667	67.875	71.500
	28	5.000	5.375	10.875	17.125	23.875	36.375	41.500	54.750	58.292	61.500	67.750
	35	5.000	5.875	15.875	19.375	26.750	26.875	28.000	31.000	32.500	35.875	36.313

注:表中数据为3个重复组平均数,\*表示差异显著(P<0.5)

### 2.4.2 温度对3株诱变株系色素积累的影响

由图4可见,在温度为22℃时,3个诱变株系和出发株(BJ38)单位体积藻液β-胡萝卜素积累量都最

大。高于22℃时随温度的升高,出发株和诱变株单位体积藻液的β-胡萝卜素积累量减少。除OUC21外,15℃时其余株系单位体积藻液β-胡萝卜素含量

高于 35℃ 时的。

株系之间,在适于藻积累 β-胡萝卜素的温度下 (22℃), 诱变株 OUC36 单位体积藻液 β-胡萝卜素质量浓度最大, 为 7.90 mg/L, 略高于出发株 (7.84 mg/L), OUC21 (5.31 mg/L) 最小。该温度下, 出发株与诱变株藻细胞 β-胡萝卜素含量依次为 BJ38 为 12.30 pg/个、OUC21 为 8.17 pg/个、OUC36 为 11.01 pg/个和 OUC66 为 9.20 pg/个, 出发株要明显高于诱变株系, 甚至比 OUC21 要高 50% 左右, OUC21 藻细胞 β-

胡萝卜素含量同样是最底的。这和作者在光照实验中得到的结论一致。

图 5 为温度对出发株及诱变株叶绿素积累的影响, 总的趋势是单位体积藻液叶绿素的积累是随着温度的升高而增加的, 只有出发株在 28℃ 时的积累量略高于 35℃ 时的。而且与光照的实验相同的是, 对应温度下所有诱变株单位体积藻液叶绿素的积累量要高于出发株 BJ38。3 个诱变株系之间在叶绿素的积累量上差异不显著。

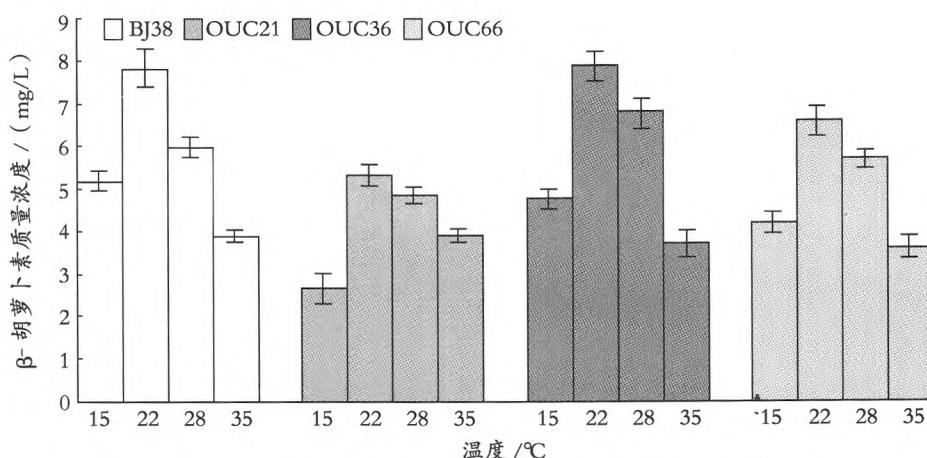


图 4 温度对 3 株诱变株系和出发株 β-胡萝卜素积累的影响

Fig. 4 Effect of temperature on accumulation of β-carotene of the initial strain and the selected three mutants

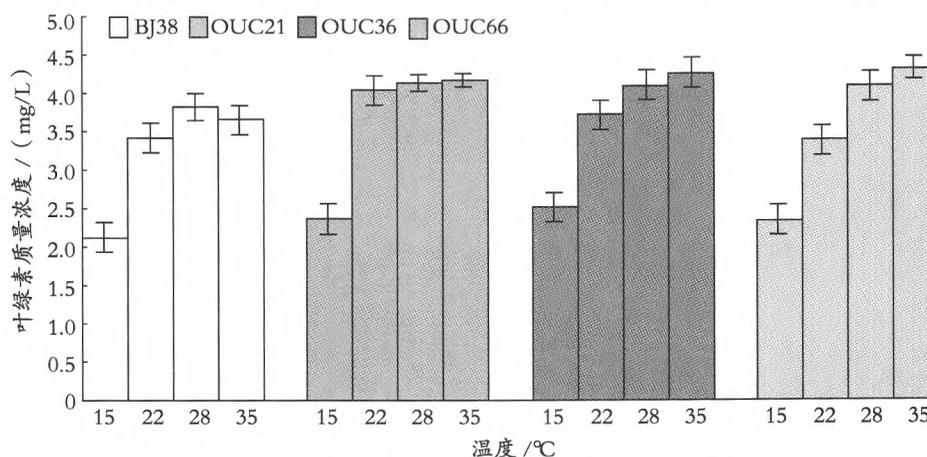


图 5 温度对出发株和 3 株诱变株系叶绿素积累的影响

Fig. 5 Effect of temperature on accumulation of chlorophyll of the initial strain and the selected three mutants

### 3 讨论

紫外线辐射是一种有效的细胞诱变方法, 它有着干净、易处理, 并能使培养达到无菌等优点, 因而深受研究者重视<sup>[28]</sup>。尽管已有研究者研究了紫外线对两种盐藻细胞 β-胡萝卜素的光合成和光保护的影响<sup>[29]</sup>, 但利用紫外线进行盐藻藻种的选育尚未见报

道。从本实验的初步试验结果来看, 盐生杜氏藻作为天然的原生质体, 利用已在工业微生物领域证明了行之有效的紫外诱变方法进行藻种选育是完全可行的, 尤其适用于以提高生物量为目的的工业化生产, 而作者实验中得到的诱变株 OUC36 单位体积藻液的 β-胡萝卜素含量也稍高于出发株, 显示了更好的养殖潜力。

关于诱变剂的使用剂量,一般认为经处理后细胞存活率应在 50% 以上为宜<sup>[28]</sup>。但相比于其他进行紫外诱变的藻<sup>[29~31]</sup>,盐生杜氏藻对紫外线的抵抗能力明显增强,因此当选择辐射剂量时,使用 30 W 的紫外灯辐射,距离 15 cm,辐射时间 10 min 时死亡率才刚刚超过 50%,作者为了获得较多的变异株加大了使用的诱变剂量,考虑到辐射剂量过大,死亡率太高,剩下的都是厚壁和处理时不活跃的细胞,作者认为选择 20 min 为宜。

在紫外诱变育种中,可以产生各种各样的变异,突变体的初步筛选存在很多困难,一是群体大,突变株少,逐株对某一性状,尤其是非直观的生理生化性状加以鉴定,存在操作和经济上的困难;二是一些突变无法通过肉眼鉴别或仪器分析方法来选择;三是由于受到显隐性关系的制约,隐性性状在杂合体中不能表达或是一些数量性状因受环境条件的影响而难以正常表达。作者进行盐生杜氏藻的紫外诱变的目的是筛选到高生物量、高  $\beta$ -胡萝卜素产量的突变株,因此首先采用直观性状对诱变株进行初步筛选,即粗筛选,直观形状包括藻细胞密度、形态、活泼性、藻液颜色等。但是由于从平板上直接转入培养基中的藻株并不是处在同一生理状态,因此这样做的后果很可能是漏掉一些优良藻株以及选择一些没有发生变异的藻株。为避免后一种情况的发生,作者正考虑运用 DNA 分子标记进行藻种的初步选育,比如目前已广泛应用的 RAPD, RFLP, SSR 技术对突变体进行初步筛选,以保证得到突变株系。另外,目前盐生杜氏藻的光合作用、 $\beta$ -胡萝卜素合成的酶基因正逐步被揭开,对于以提高  $\beta$ -胡萝卜素产量为目的的诱变筛选有可能实现用这些基因的引物对突变体进行扩增,根据扩增产物确定理想的突变体。这些工作有待于随着研究工作的深入一步步得到解决。

作者筛选到的 3 株诱变株生长速率比出发株都有不同程度的提高,尤其是诱变株 OUC36,另外,3 株诱变株的一个共同特点是叶绿素的含量要高于出发株。作者推测紫外线辐射加速了叶绿素的合成,从而刺激了叶绿体的发育,在诱变株恢复生长后观察到诱变株的色素体清晰可见也从一个侧面证明了作者的推测。这点作者得到的结论与庄惠如<sup>[30,31]</sup>在用紫外线处理雨生红球藻时得到的结论一致。

另外,光照、温度实验中都显示 3 株诱变株的藻细胞  $\beta$ -胡萝卜素含量低于出发株,原因是  $\beta$ -胡萝卜素可以起到光保护的作用,在紫外照射时合成于中性脂质小滴中类囊体片层之间的  $\beta$ -胡萝卜素有部分降解以保护细胞免受伤害。Andrea 等<sup>[29]</sup>的研究也证实,当用 UV-A 处理处在低光和光饱和下培养的两种盐藻时,观察到光系统 II 电子传递效率的缺失以及自由基的增加,大大提高了抗坏血酸过氧化物酶的活性,使得抗坏血酸浓度得以提高,证实了积累的  $\beta$ -胡萝卜素可以通过某些反应阻止藻细胞被紫外线伤害。但有一点需要指出的是,由于诱变株的生长速率的大幅度提高,使得诱变株 OUC36 单位体积藻液  $\beta$ -胡萝卜素的积累量高于出发株。

作者最终筛选的 3 株诱变株系中,OUC21 积累  $\beta$ -胡萝卜素的能力明显是最差的,OUC66 在多方面都比较接近出发株,而 OUC36 生长速率是最快的,积累  $\beta$ -胡萝卜素能力也是 3 株藻中最强的,总的  $\beta$ -胡萝卜素含量也高于出发株。因此 OUC36 是最有可能作为生长速度快、积累  $\beta$ -胡萝卜素能力强的优良藻种进行大规模生产的。

盐生杜氏藻的生长和  $\beta$ -胡萝卜素积累是两个不同的生理过程,适于藻生长的生态条件往往不利于藻积累  $\beta$ -胡萝卜素。但作为盐生杜氏藻的大规模培养,期望在获得最大生物量的同时也能获得最大的  $\beta$ -胡萝卜素产量,藻种的选育则成为最有效、最经济的途径,本研究结果显示紫外线诱变处理是值得今后重视的新途径。

#### 参考文献:

- [1] 孙福璋. 根据  $\beta$ -胡萝卜素合成机制改进盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 培养方法的研究[J]. 烟台大学学报, 1992, 1-2: 119-125.
- [2] Assen A J, Eimhjellen K E, Liaaen-Jensen S. An extreme source of beta-carotene[J]. *Acta Chem Scand*, 1969, **23**(7): 2 544-2 545.
- [3] Borowitzka L J, Borowitzka M A, Moulton T. Mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant [J]. *Hydrobiologia*, 1984, 116/117: 115-121.
- [4] 张学颖, 段舜山, 刘振乾, 等.  $Cr^{3+}$  对盐藻生长及营养品质的影响[J]. 生态科学, 2003, **22**(2): 138-141.

- [5] 高清潭, 丁淑华. 盐藻养殖生产  $\beta$ -胡萝卜素新方式[J]. 海湖盐与化工, 1996, **26**(1):25-28.
- [6] 刘建国, 吴超元. 盐藻和  $\beta$ -胡萝卜素研究述评[J]. 海洋与湖沼, 1995, **26**(3): 323-329.
- [7] 陈哈华, 钱凯先. 氮磷比对盐藻生长及其  $\beta$ -胡萝卜素积累的影响[J]. 浙江大学学报, 1997, **31**(6): 732-735.
- [8] Ben-Amotz A, Avron M. On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*[J]. **Plant Physiol**, 1983, **72**: 593-597.
- [9] Borowitzka M, Borowitzka L, Kessly D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina* [J]. **J Appl Phycol**, 1990, **2**: 111-119.
- [10] Orset S, Young A. Low temperature induced synthesis of  $\alpha$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) [J]. **Journal of Phycology**, 1999, **35**(3): 520-527.
- [11] Orset S, Young A. Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene in *Dunaliella salina* (Teod)[J]. **Plant Physiol**, 2000, **122**(2): 609-617.
- [12] Lers A, Biener Y, Zamir A. Photoinduction of massive  $\beta$ -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*[J]. **Plant Physiol**, 93: 389-395.
- [13] Cunningham F X, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants [J]. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 1998, **49**(1): 557-583.
- [14] Patricia I. Gómez, Mariela A, et al. Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences[J]. **Aquaculture**, 2004, **233**(2):149-162.
- [15] 吕玉民, 姜国忠, 薛乐勋, 等. 杜氏盐藻 2 种碳酸酐酶基因跨内含子 DNA 序列的克隆和鉴定[J]. **Journal of Zhengzhou University**, 2004, **39**(1):23-25.
- [16] 潘卫东, 袁保梅, 薛乐勋, 等. 杜氏盐藻叶绿体转化载体 pDS16S-CAT 的构建[J]. **Journal of Zhengzhou University**, 2004, **39**(1):25-29.
- [17] 郑鸣, 白林晗, 乔代蓉, 等. 盐生杜氏藻 *cbr* 基因的克隆[J]. 四川大学学报, 2003, **40**(3):590-594.
- [18] 张晓宁, 王昊, 陈火英, 等. 盐藻启动子活性片段的克隆及序列分析[J]. 复旦大学学报, 2002, **41**(2):227-229.
- [19] Cifuentes A, Gonzalez M, Conejeros M, et al. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile[J]. **J Appl Phycol**, 1992, **4**: 111-118.
- [20] 杜金华, 张开利, 杜连祥. U. V 诱变法选育 pof-糖化酵母[J]. 食品与发酵工业, 1995, **6**:33-38.
- [21] 王戈博, 刘向阳, 李三相, 等. 用紫外线诱变及紫外十硫酸二乙酯复合诱变方法选育高产异淀粉酶菌株[J]. 青海大学学报, 2003, **21**(4):7-10.
- [22] 李明, 李淑琴, 张淑霞. 紫外线诱变对平菇双核菌生长及细胞形态结构的影响[J]. 河北农业大学学报, 1994, **17**(2):99-101.
- [23] 张永军, 刘爱英, 梁宗琦. 紫外线对蝉拟青霉原生质体的诱变效果[J]. 贵州农业科学, 1998, **26**(6):1-3.
- [24] 冯清平, 薛林贵. 紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究[J]. 兰州大学学报, 1995, **31**(3):100-106.
- [25] 陈春涛, 王岁楼, 卫军. 产类胡萝卜素酵母菌原生质体的制备、再生与诱变[M]. 生物技术, 2002, **12**(3):23-25.
- [26] 张雪松, 李会良, 张心平, 等. 利用紫外线诱变原生质体筛选四环素高产菌株的研究[J]. 河北大学学报, 1997, **17**(3):39-42.
- [27] Jensen A. Handbook of Phycological Methods[M]. Cambridge, England: Cambridge Univ Press, 1978.
- [28] 黄世玉, 王志勇. 紫外线辐射坛紫菜离体细胞的初步试验[J]. 集美大学学报, 1997, **2**(1):25-30.
- [29] Andrea L W, Leland S J. Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of  $\alpha$ -carotene in two *Dunaliella* spp. [J]. **Plant and Cell Physiology**, 2002, **43**(8): 877-884.
- [30] 庄惠如, 陈必链, 陈荣, 等. 雨生红球藻的紫外、激光复合诱变育种[J]. 激光生物学报, 2001, **10**(2):135-139.
- [31] 庄惠如, 王明兹, 陈必链, 等. 雨生红球藻对紫外光处理的响应及高产藻株的选育[J]. 福建师范大学学报, 2001, **17**(3):76-80.

# Effects of light intensity and temperature on the growth and pigment accumulation of ultraviolet radiation mutagenized productive *Dunaliella salina* Mutants

MENG Zhen<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue-cheng<sup>2</sup>, SHI Yan-xia<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China; 2. College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct. , 11, 2005

**Key words:** *Dunaliella salina*; ultraviolet radiation; mutagenesis;  $\beta$ -carotene

**Abstract:** Mutagenesis by ultraviolet radiation of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) (strain BJ38) was carried out in this paper. Subsequently, effects of light intensity and temperature on growth and pigment accumulation of the selected three mutants (OUC21, OUC36, OUC66) were studied. Results revealed that growth performances of all the mutants and the initial strain (BJ38) were remarkable at the light intensity of  $214.08 \mu \text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Under the condition, moreover, cell density of OUC36 ( $86.6 \times 10^4$  cells /mL) was 25% high compared to BJ38 ( $69.1 \times 10^4$  cells /mL). However,  $\beta$ -carotene accumulation of OUC36 (10.76 mg/L) was just a little higher than BJ38 (10.1 mg/L), while OUC21 (6.68 mg/L) accumulated the least. Chlorophyll accumulation in all the selected mutants was proved to be greater than BJ38 under any light intensity. In the case of temperature, better growth performances were shown at 22°C (OUC66 and BJ38) and 28°C (OUC21 and OUC36) respectively. However, it was at 22°C that all strains including BJ38 accumulated more  $\beta$ -carotene, where accumulation of OUC36 (7.9 mg/L) was not remarkably greater than BJ38 (7.84 mg/L) when OUC21 (5.31 mg/L) performed poorest. Meanwhile, regardless at which temperature the culture was done, all the mutants accumulated more Chlorophyll than the initial strain (BJ38). It could therefore be concluded that OUC36 sounds potential suitability for large scale cultivation.

(本文编辑:张培新)