

诱变剂亚硝基胍对海洋微藻卡德藻细胞形态及生长的影响 *

邹立红¹ 张学成^{2**}

(¹中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(²中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 利用化学诱变剂亚硝基胍(MNNG)处理海洋单细胞绿藻卡德藻(*Tetraselmis* sp.),观测其对细胞形态和生长的影响。结果表明:MNNG导致卡德藻细胞出现鞭毛脱落、细胞膨胀、内部结构松散、胞质分布不均匀、色素体异常、产生休眠孢子以及致畸、致死等现象;MNNG对卡德藻在群体水平上的生长有明显的抑制作用,细胞死亡率与诱变剂剂量正相关,MNNG对卡德藻处理 120 min 的半致死浓度 LC₅₀为 20 μg/L。

关键词 亚硝基胍(MNNG),卡德藻(*Tetraselmis* sp.),诱变,细胞形态,生长速率
中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)08-0047-05

卡德藻(*Tetraselmis* sp.)富含多不饱和脂肪酸,是海水养殖动物的优质开口饵料和产业化生产多不饱和脂肪酸的理想材料,利用诱变育种的方法可以进一步改良其种质,MNNG是一种强化学诱变剂,主要引起碱基置换和移码突变^[1],国内外关于MNNG在藻类诱变

* 国家“863”计划资助项目 819-02-01 号。

第一作者:邹立红,出生于 1973 年,硕士。

** 通讯作者, E-mail:xczhang@ouqd.edu.cn

收稿日期:2003-01-18;修回日期:2003-03-30

中的应用已有不少报道,如 1995 年 Sivan 等用 MNNG 诱变紫球藻,得到抗除草剂 DCMU 的突变品系;殷春涛等 1997 年用 MNNG 处理钝顶螺旋藻,得到藻丝形态明显改变,能够耐受低温的一株突变品系等。然而现有报道多集中在选育结果上,对选育过程描述不多,本文报道了 MNNG 处理后卡德藻细胞形态结构的变化,研究了诱变剂与微藻生长的量效关系,探索了诱变操作的最佳剂量,为微藻的良种选育和深入开展诱变机理研究提供了参考。

1 材料和方法

1.1 藻种及培养条件

卡德藻 (*Tetraselmis* sp.) 属绿藻门,绿藻纲,团藻目,塔形藻亚目,扁藻科。营单细胞生活,卵形侧扁,约 12~14 μm 长,5~7 μm 宽,顶生鞭毛 4 根,两长两短,游动迅速,细胞内有一大的杯状色素体,有眼点。藻种来自加拿大纽芬兰。培养条件为:温度 15~25 $^{\circ}\text{C}$,盐度 32 左右,光强 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$,光周期 L:D=12:12,培养液成分: NaNO_3 60 mg/L, KH_2PO_4 4 mg/L, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.5 mg/L。

1.2 亚硝基胍处理卡德藻

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 分子式为 $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_3$, 瑞士 Fluka 公司产品。

取对数期生长的藻液, 2 000 r/min 离心收集细胞, 用 0.2 mol/L 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 (pH=5.8) 悬浮细胞至 2×10^7 个/mL 左右, 分装入三角瓶, 每瓶 200 mL。加入 MNNG 储备液 (95% 乙醇助溶, 体积影响忽略不计), 使 MNNG 的终浓度依次为 80、40、20、10、5、0 $\mu\text{g/L}$, 每个浓度设 2 个平行样, 摇床 100 r/min 处理 120 min, 离心去除处理液, 用新鲜培养液离心洗涤 3 次后重悬细胞, 20 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 弱光培养。每 24 h 在显微镜下观察细胞形态结构的变化, 并用 7520 型分光光度计测藻液在 680 nm 的吸光值, 血球计数板计活细胞数 (凡细胞或叶绿体结构无明显破损的按活细胞计数), 连续观测 5 d 后, 向各瓶补充新鲜培养液 100 mL, 培养 10 d 后再次开始测量, 进行 5 d。

比生长速率 (Specific Growth Rate) 的计算公式为:

$$K = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

式中, t 为时间 (d), N_0 、 N_t 分别为实验开始和结束时的 $\text{OD}_{680\text{nm}}$ 值。

MNNG 对卡德藻细胞的半致死浓度 LC_{50} 据 Karber

氏法^[2]计算:

$$\lg \text{LC}_{50} = X_m - i(\sum p - 0.5)$$

式中, X_m 为最大剂量的对数值, i 为相邻剂量比值的对数, P 为各组细胞死亡率。

细胞死亡率 = $[(C_n - C_{n+1}) / C_n] \times 100\%$, 其中, C_n 为第 n 次活细胞计数结果, C_{n+1} 为第 $n+1$ 次活细胞计数结果。

实验重复 2 次, 取平均值。

2 结果

2.1 MNNG 对卡德藻细胞形态的影响

镜检结果显示: 对照组细胞结构完整, 游动活泼, 杯状色素体清晰可见 (图 1-1)。处理组细胞存在以下异常现象: (1) 鞭毛脱落, 细胞活动能力大大降低, 游动细胞的比例随诱变剂浓度的增加而迅速减少, 40 $\mu\text{g/L}$ 以上基本为零; (2) 细胞质固缩, 胞壁加厚, 形成圆球形的休眠孢子 (图 1-2); (3) 细胞畸形, 正常细胞为卵形, 畸形细胞呈钟罩形、梨形或其它不规则形状 (图 1-3); (4) 细胞膨胀, 正常细胞约 12~14 $\mu\text{m} \times 5 \sim 7 \mu\text{m}$ (长 \times 宽), 膨大细胞可达到 25 $\mu\text{m} \times 18 \mu\text{m}$ 左右 (图 1-4); (5) 细胞内部结构松散, 最明显的是色素体的变化, 呈网状破碎或弥散状态 (图 1-5); (6) 细胞部分空化, 内容物向局部集中 (图 1-6); (7) 细胞解体死亡、内含物外溢; (8) 处于分裂期的细胞对 MNNG 的作用十分敏感, 观察中所有分裂期细胞均为畸形 (图 1-7), 分离后单独培养, 无一例成活。

特别要指出的是: 以上现象在各处理组都能观察到, 只是随着浓度的升高, 异常及死亡细胞的比例增加, 说明卡德藻对 MNNG 敏感, 低浓度 MNNG 即可导致细胞发生各种异常现象; MNNG 处理后超过 20 d, 在各处理组中仍观察到畸形细胞的存在, 这一现象说明卡德藻细胞形态结构的异常不是由 MNNG 毒性所造成的暂时现象, 而是细胞遗传物质发生可遗传的改变, 是 MNNG 诱变的结果。

2.2 MNNG 对卡德藻生长的影响

MNNG 对卡德藻生长有明显的抑制作用, 卡德藻比生长速率与 MNNG 浓度的关系如图 2 所示, 其中, K_1 、 K_2 分别为 MNNG 处理后第 1~5 天、第 16~21 天测量的比生长速率。可以看出: 随着 MNNG 浓度的升高, 卡德藻生长速率明显降低, 在 5~20 $\mu\text{g/L}$ 浓度区间内, 生长速率大幅降低, 至 80 $\mu\text{g/L}$ 浓度 K 值降低了 90% 以上, 其中 K_2 还出现了负增长。回归分析的结果显示: 生长速率与诱变剂浓度显著负相关, K_1

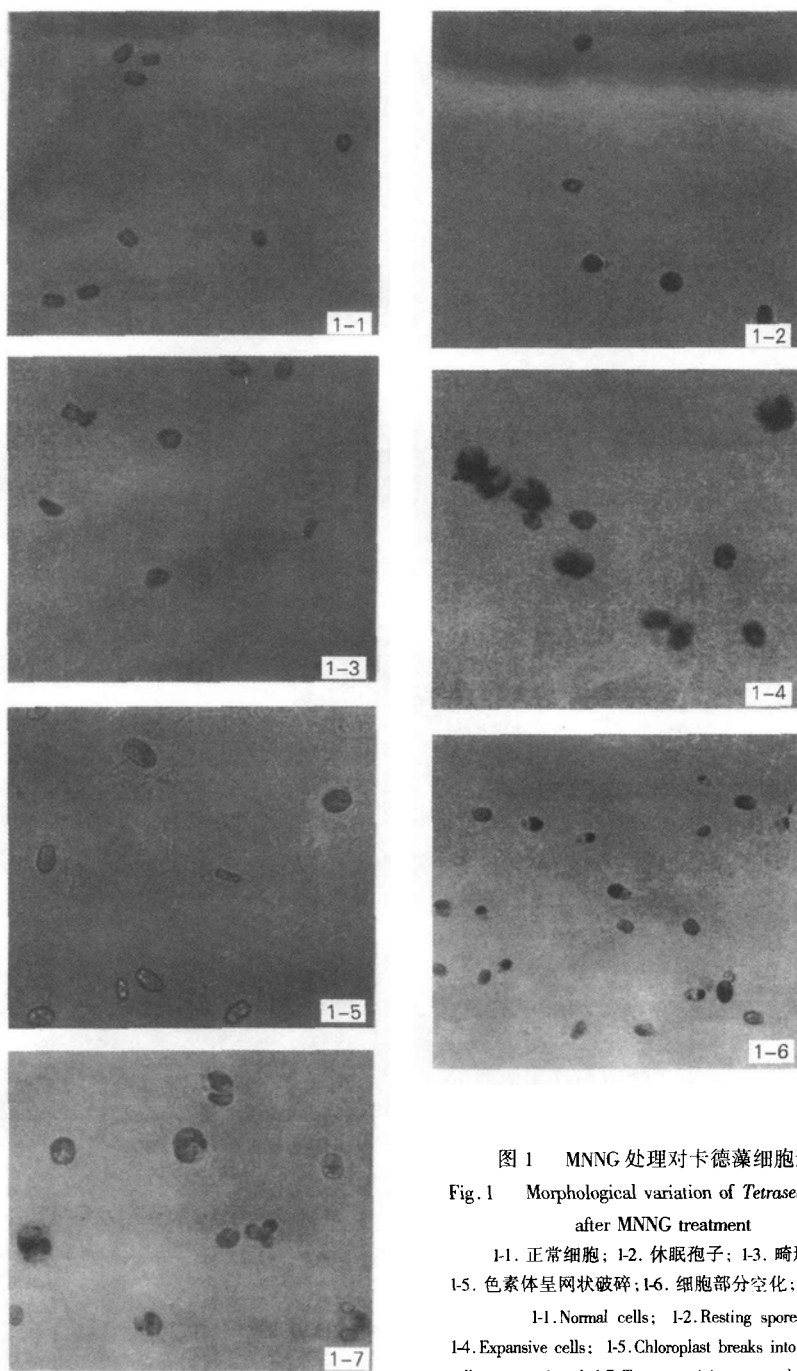


图 1 MNNG 处理对卡德藻细胞形态结构的影响

Fig. 1 Morphological variation of *Tetraselmis* sp. cells after MNNG treatment

1-1. 正常细胞; 1-2. 休眠孢子; 1-3. 畸形细胞; 1-4. 膨胀细胞;
1-5. 色素体呈网状破碎; 1-6. 细胞部分空化; 1-7. 分裂中的细胞畸形
1-1. Normal cells; 1-2. Resting spores; 1-3. Teratogenic cells;
1-4. Expansive cells; 1-5. Chloroplast breaks into reticulation; 1-6. Part of cells were cavitated; 1-7. Teratogenicity occurred as cell division

的回归方程为 $y = -0.0047x^2 - 0.0348x + 0.2589$, 相关性系数为 0.9729, K_2 的回归方程为 $y = -0.0171x^2 + 0.0163x + 0.2298$, 相关性系数为 0.9897。

图 2 中, K_1 和 K_2 两条曲线的趋势近似, 可以得出: 两次测量虽然间隔了 10 d, 但各组的生长速率仍基本维持原有水平, 无明显变化。其中, K_2 在低浓度

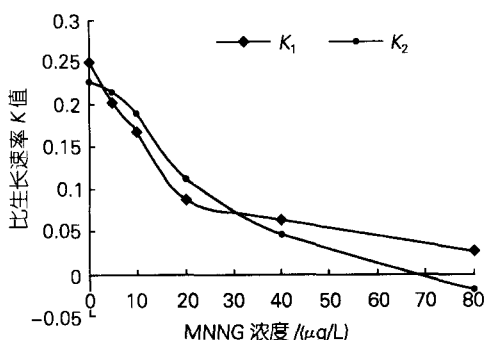


图2 MNNG浓度与卡德藻比生长速率的关系 (处理时间为120 min)

Fig.2 Relationship between MNNG concentrations and the specific growth rate of *Tetraselmis* sp. (treated 120 min)

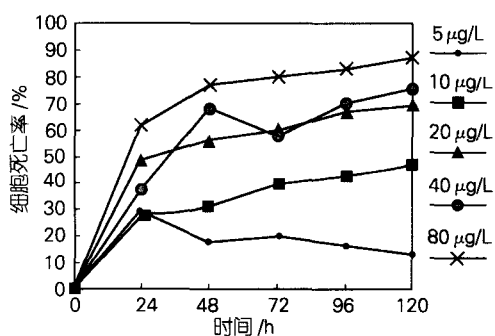


图3 不同浓度MNNG处理下卡德藻细胞的死亡率

Fig.3 Cell mortality rate of *Tetraselmis* sp. under different concentration of MNNG

组比相应的 K_1 略高,而在高浓度组则比相应的 K_1 低,说明低浓度MNNG处理的细胞经过一段时间培养后生物量有所恢复,而高浓度处理组的细胞群体生长状况没有得到明显的改善。

MNNG对卡德藻细胞有致死作用,图3示MNNG处理后每24 h测定的细胞死亡率。可以看出:MNNG处理浓度越高,细胞死亡率越高。处理后第24小时各组的活细胞计数明显减少,大量细胞死亡,80 $\mu\text{g/L}$ 的高浓度组细胞死亡率为60%左右,低浓度组的死亡率也达30%左右。从图3还可以看出:各组的细胞死亡率在48 h后基本上趋向稳定,推断MNNG处理后第48小时体系中活细胞分裂缓慢成为死亡率居高不下的主要原因。以第48小时的细胞死亡率计算

表1 不同浓度MNNG处理下细胞的死亡率和畸形率(处理后第48小时测定)

Tab.1 Mortality rate and abnormal proportion of cells under different concentration of MNNG(mensurated at 48h after treatment)

MNNG 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	细胞死亡率 (%)	细胞畸形率 *
5	17.3	31.4
10	30.8	23.0
20	56.0	67.4
40	68.0	83.0
80	77.0	100

* 指畸形细胞占各自活细胞的比例。

MNNG的半致死浓度,得出MNNG对卡德藻处理120 min的半致死浓度 $LC_{50} = 20 \mu\text{g/L}$ 。

同时,我们统计了第48小时各组的细胞畸形率,结果见表1。得到MNNG处理后第48小时的细胞畸形率以80 $\mu\text{g/L}$ 组最高,镜检存活细胞均为畸形,10 $\mu\text{g/L}$ 处理组的细胞畸形率最低,而5 $\mu\text{g/L}$ 组的细胞畸形率较10 $\mu\text{g/L}$ 稍高,可能与细胞的应激反应有关。细胞的半致死浓度20 $\mu\text{g/L}$ 处理组的细胞畸形率为67.4%,作者认为这一剂量所造成的细胞畸形率较高而死亡率有限,是一个适合突变体选出的剂量,可以作为MNNG对卡德藻诱变的操作剂量。

3 讨论

MNNG属烷化剂,能与核酸碱基起化学反应并停留在原位,造成DNA复制时碱基配对错误。MNNG广泛应用于细菌、真菌诱变^[3,4],在藻类中,已成功用于螺旋藻(*Spirulina* sp.)、紫球藻(*Porphyridium* sp.)、角刺藻(*Chaetoceros*)、莱茵哈德衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、紫菜(*Porphyra* sp.)等多种材料的诱变育种和遗传学研究^[5,6]。MNNG的诱变效果与其使用剂量和作用方式有着直接的关系,在以往的操作中,MNNG多直接加入材料的液体培养体系,也有的将MNNG添加到固体培养基中,如,1982年陈中孚等提出一种在含MNNG的平板上直接进行诱变的操作方法。作者曾在预实验中比较了两种方式,发现固体方式不适于微藻诱变,因为同样诱变剂浓度下微藻细胞在平板上死亡率过高,从而造成操作周期长,诱变结果不稳定等。

关于MNNG的使用剂量在以往报道中存在着数量级的差别,如1996年何蕙霞等对黑麦角菌进行

诱变采用的 MNNG 浓度为 6 mg/mL, 处理时间 60 min; 1992 年张学成等诱变角刺藻所使用的 MNNG 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理时间 30~120 min; 严兴洪等对条斑紫菜叶状体以 10~30 $\mu\text{g}/\text{L}$ MNNG 处理 30 min 得到部分点状色素突变体¹⁵等。本实验根据 MNNG 对卡德藻细胞形态和生长的影响得出 MNNG 对卡德藻诱变的最佳剂量为 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 处理 120 min, 在此剂量下, 细胞半数死亡, 由诱变剂所造成的致死突变率有限, 可以保证充足的可筛选数量, 同时, 这一剂量下细胞畸形率约 67%, 细胞的变异丰富, 有利于正向突变体的选出。本实验所采用的诱变剂剂量比多数报道要低, 可能与实验材料的敏感性不同有关, 卡德藻对 MNNG 敏感, 低剂量 MNNG 即造成细胞形态及生长上的明显改变。

MNNG 对卡德藻的诱变作用可以从以下两方面得到证实:

(1) MNNG 处理后, 卡德藻部分细胞发生畸形(如图 1-3 所示), 经过 20 d 以上的培养, 畸形细胞的数量虽然有所减少但仍然存在, 卡德藻在正常情况下代时约为 1.5 d, 推算这期间活细胞至少繁殖 10 代以上, 说明存活的畸形细胞是遗传物质突变的结果。可能变异细胞的细胞壁结构在 MNNG 作用下发生了真实可遗传的变异。

(2) MNNG 处理后卡德藻第 16~21 天的生长曲线与 1~5 天的曲线趋势接近, 低浓度组的 K_2 值比相应的 K_1 略有增加, 高浓度组的 K_2 值比相应的 K_1 低, 说明 MNNG 对微藻生长的抑制作用包括两个层次: 一个是短期影响, 即对细胞造成暂时性生理抑制; 另一个是长期影响, 即改变了微藻的遗传性状, 表现为群体水平的生长速率发生了不可恢复的变化。

参考文献

- 1 孙勇如. 遗传学手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1989
- 2 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学. 天津: 天津大学出版社, 1993
- 3 吴江, 刘子贻, 朱寿民. 烷化剂 NTG 诱变虾青素产生菌红法夫酵母的研究. 微生物学通报, 2001, 28(2): 33-37
- 4 谢志雄, 陈向东. 细菌感受态细胞摄取和分泌 DNA 的相关性研究. 遗传, 1999, 21(1): 23-25
- 5 严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. 水产学报, 2000, 24(3): 221-228
- 6 Adam M, Loppes R. Use of the ARG7 gene as an insertional mutagen to clone PHON 24, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Molecular and General Genetics, 1998, 258(1-2): 123-132

EFFECTS OF MUTAGEN MNNG ON CELL MORPHOLOGICAL CHANGE AND GROWTH OF MARINE MICROALGA *Tetraselmis* sp.

ZOU Li-Hong¹ ZHANG Xue-Cheng²

(¹Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(²College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Received: Jan., 18, 2003

Key Words: MNNG, *Tetraselmis* sp., Mutagen, Morphological change, Growth

Abstract

The effects of mutagen MNNG on marine microalgae *Tetraselmis* sp. were studied in this experiment. Microalgal cells were treated for 120 minutes under different concentration of MNNG (80, 40, 20, 10, 5, 0 $\mu\text{g}/\text{L}$). Results showed that *Tetraselmis* sp. were sensitive to MNNG, morphological abnormality or even dead cells were observed, and growth was inhibited as well. LC_{50} of MNNG to *Tetraselmis* sp. at 120 min was 20 $\mu\text{g}/\text{L}$, and this dose can be act as an optimal one in the operation of inducing mutagenesis. It suggests that MNNG is an effective mutagenic agent in microalgal breeding and genetics study. (本文编辑: 张培新)