

亚硝基胍 (NTG) 对雨生红球藻的诱变效应

陆开形¹, 蒋霞敏, 翟兴文

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 用浓度分别为 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g/L 的亚硝基胍 (NTG) 处理雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*), 处理后的藻细胞分别置于 100 mL 三角烧瓶培养, 3d 后用细胞计数测定抑制率。结果表明, NTG 浓度为 2.5 g/L 时生长 K 值最大, 为 0.389; 藻液的细胞干质量最大, 为 0.711 g/L; 虾青素含量也最多, 为 1.869 75 mg/L, 之后随着浓度的增加反而下降。

关键词: 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*); 亚硝基胍; 抑制率; 诱变效应

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0049-04

天然虾青素具有重要的医疗保健价值^[1], 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 又是天然虾青素的重要资源藻类^[2-4], 因此开发红球藻生产虾青素具有极大的市场前景。目前, 只有少数企业利用红球藻规模生产虾青素^[2], 其原因主要是由于在其产业化开发过程中, 人们面临着许多困难, 如: 生长慢、适温范围窄、易污染、提取工艺复杂等^[5]。因此, 通过诱变育种培育

优良藻株是解决问题的关键。

收稿日期: 2002-12-16; 修回日期: 2003-04-15

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (301208)

作者简介: 陆开形 (1972-), 女, 浙江大学在读研究生, E-mail: LUKAIXING@yahoo.com.cn

诱变育种是人为利用各种物理、化学和生物等因素诱导生物遗传性发生变异,根据育种目标从变异后代中选育出新品种或获得有利用价值的种质资源^[6]。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。自从1927年Muller用X射线诱发出果蝇大量突变从而发现X射线能引起生物遗传性的变异以来,诱变育种已经取得了可喜的成就^[6]。目前,诱变育种广泛利用的一类重要化合物是烷化剂^[6],其中烷化剂N'-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)有超级诱变剂之称^[7]。作者利用NTG对雨生红球藻进行诱变,希望获得优良藻种。

1 材料与方 法

1.1 藻种及培养基

雨生红球藻由中国科学院水生生物研究所典型培养物保藏委员会淡水藻种库提供,所有培养物均以浙江水产学院3号母液MAV培养基为基础培养基(表1)。

表1 MAV培养液配方

Tab.1 Composition of culture fluid

营养盐	含量(mg/L)
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.5
MnSO ₄	0.25
EDTA-Na ₂	10
VB ₁₂	5×10 ⁻⁷
VB ₁	6×10 ⁻⁶

1.2 试验方法

1.2.1 诱变方法

采用亚硝基胍处理雨生红球藻,具体过程如下:在预备实验的基础上,取浓度梯度分别为0,0.5,1,1.5,2,2.5,3,3.5 g/L的NTG处理指数生长期藻液10 mL,在25℃水浴锅中处理30 min后,离心收集藻细胞,然后用磷酸缓冲液反复清洗3次,以除去诱变剂,最后将离心收集的藻细胞分别置于100 mL三角烧瓶中进行稀释,并经12 h暗处理后转入其适宜条件下培养,3 d后经细胞计数测定各组的抑制率。按公式 $W(\%) = [A/(A+B)] \times 100\%$,其中W表示致死率,A表示死细胞数,B表示活细胞数。

1.2.2 培养条件

将不同亚硝基胍浓度处理过的藻种经代数培养后,用微吸管挑选形态特殊且个大的活细胞,再经扩

大培养后,重新接种,以相同的初始浓度(5 000个/mL)接种到100 mL三角烧瓶中,在人工条件(培养温度22℃±3℃,光照3 800 lx,日光灯为光源,光暗周期为12 h:12 h)下培养10 d后测生长情况。以上处理均设重复。

1.2.3 生长速度测定

用浮游植物计数框进行细胞计数,参照金传荫等的方法^[8]。按公式 $K = (\ln N_t - \ln N_0)/t$ 计算生长率,其中N_t表示培养t时间后的细胞数,N₀表示初始细胞数目,t表示试验时间。

1.2.4 藻液干质量的测定

取16支干净的离心管,编号后于烘箱中烘烤2 h,空气中平衡至恒量,称量后加入不同浓度的藻液,每一浓度设2个平行组,4 000 r/min离心20 min后弃上清液,于120℃温度下烘2~4 h,然后在空气中平衡至恒量,经分析天平称质量后,用减量法获得藻液细胞干质量。

1.2.5 虾青素提取及计算

取一定体积的藻液,经离心(3 900 r/min,5 min)后,加入少量30%甲醇+5%KOH溶液破坏叶绿素,处理5 min后,多次离心去除KOH甲醇溶液,然后加入一定体积二甲亚砜,于70℃处理20 min抽提至藻体变白,490 nm下测量吸光度^[9]。按公式 $C(\text{mg/L}) = (4.5A_{490} \times V_s)/V_b$ 计算,其中A表示吸光度,V_s表示二甲亚砜体积,V_b表示藻液体积^[10]。

2 结果

2.1 不同亚硝基胍浓度对雨生红球藻的抑制作用

经过不同浓度的亚硝基胍诱变处理后,雨生红球藻细胞的形态及运动能力均发生不同程度的变化,部分藻细胞在处理当天或数日后发生不同程度的褪色漂白或原生质体解体现象。经过3 d的培养后,通过细胞计数测定细胞抑制率,其结果见图1。从图1明

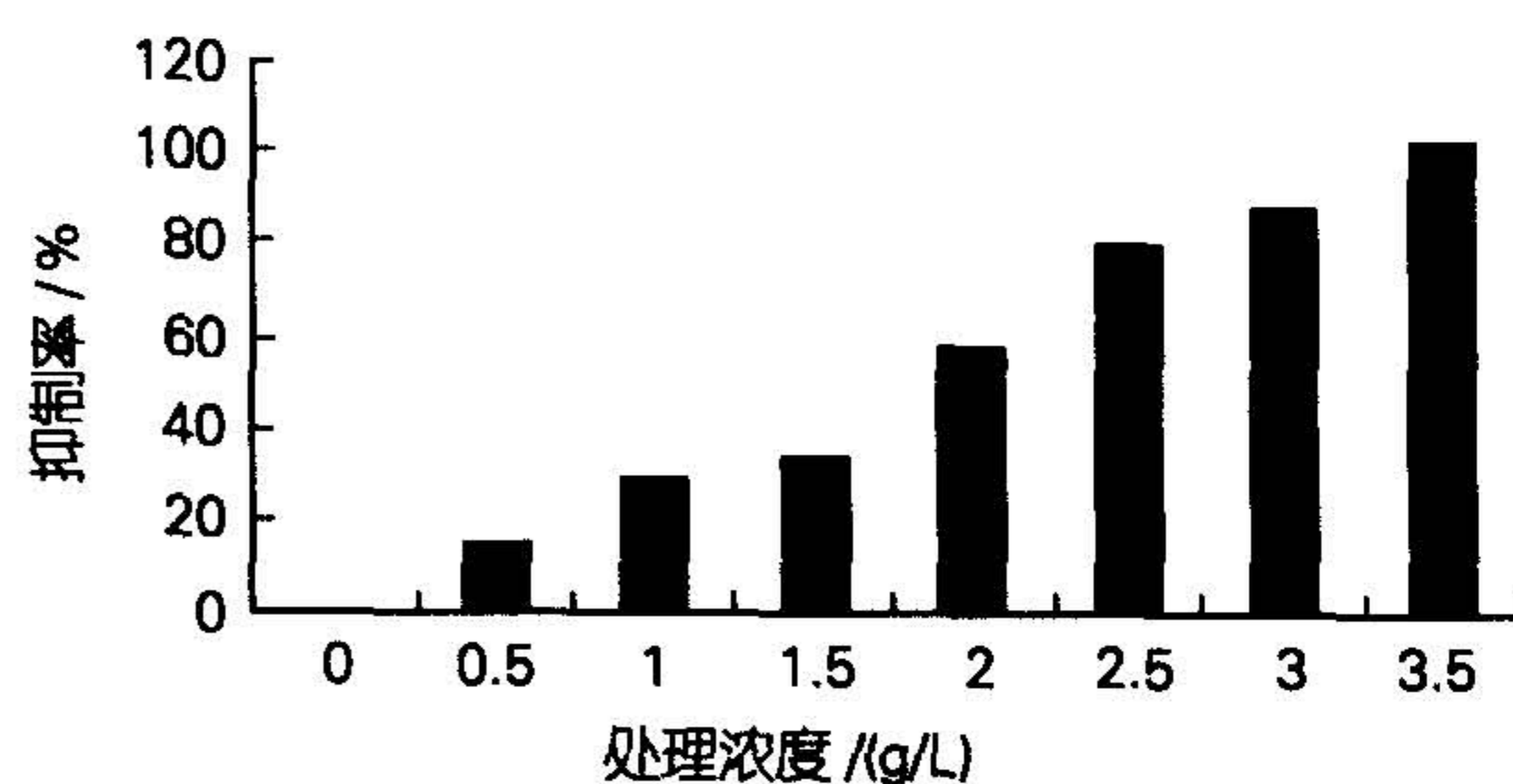


图1 亚硝基胍处理对雨生红球藻的抑制率
Fig.1 The inhibiting percentage of NTG on the growth of *Haematococcus pluvialis*

显可见：除对照组（0 浓度）外，其它各组即浓度分别为 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 g/L NTG 处理过的藻液中，都有不同数量的细胞死亡，说明即使极低浓度的 NTG 处理都会对细胞产生一定的毒害作用，并且此毒害作用随着 NTG 浓度的逐渐提升而加大，但却随时间的延长而降低。具体表现在当浓度为 3.5 g/L 时，第 3 天的抑制率达最大为 100%，其中大部分为死亡细胞，但有少量处于活力抑制状态的细胞，其抑制状态可随时间的延长而逐渐恢复，故到第 6 天时测其抑制率仅为 76%。

2.2 不同 NTG 处理对雨生红球藻生长和干物质积累的影响

扩养后的生长测定结果如图 2。由图 2 明显可见，细胞的生长 K 值和藻液质量的变化趋势基本一致，从对照组（0 浓度）到 2.5 g/L 浓度，除 0.5 g/L 浓度组的生长 K 值小于对照组外，其余的生长 K 值和藻液质量都表现出增长趋势，即经浓度为 2.5 g/L 的 NTG 处理且培养后，生长 K 值和质量达最大，分别为 0.389 和 0.711 g/L，都显著高于对照组（0.362 和 0.497 g/L），然后两者都随浓度的增加而呈下降趋势。从总体看，除 0.5 和 3.5 g/L 浓度的生长 K 值小于对照组外，其它参数都大于对照组，说明一定浓度的 NTG 处理可促进该藻的生长，而 2.5 g/L 浓度是该处理的最佳浓度。利用生长数据进行方差分析，得 $F = 26.748 > F_{0.01}(7, 8) = 6.178$ ，证明 NTG 处理对该藻的生长具极显著的影响。经多重比较表明浓度为 2.5 g/L 的 NTG 处理是促进雨生红球藻生长的最适诱变剂量。

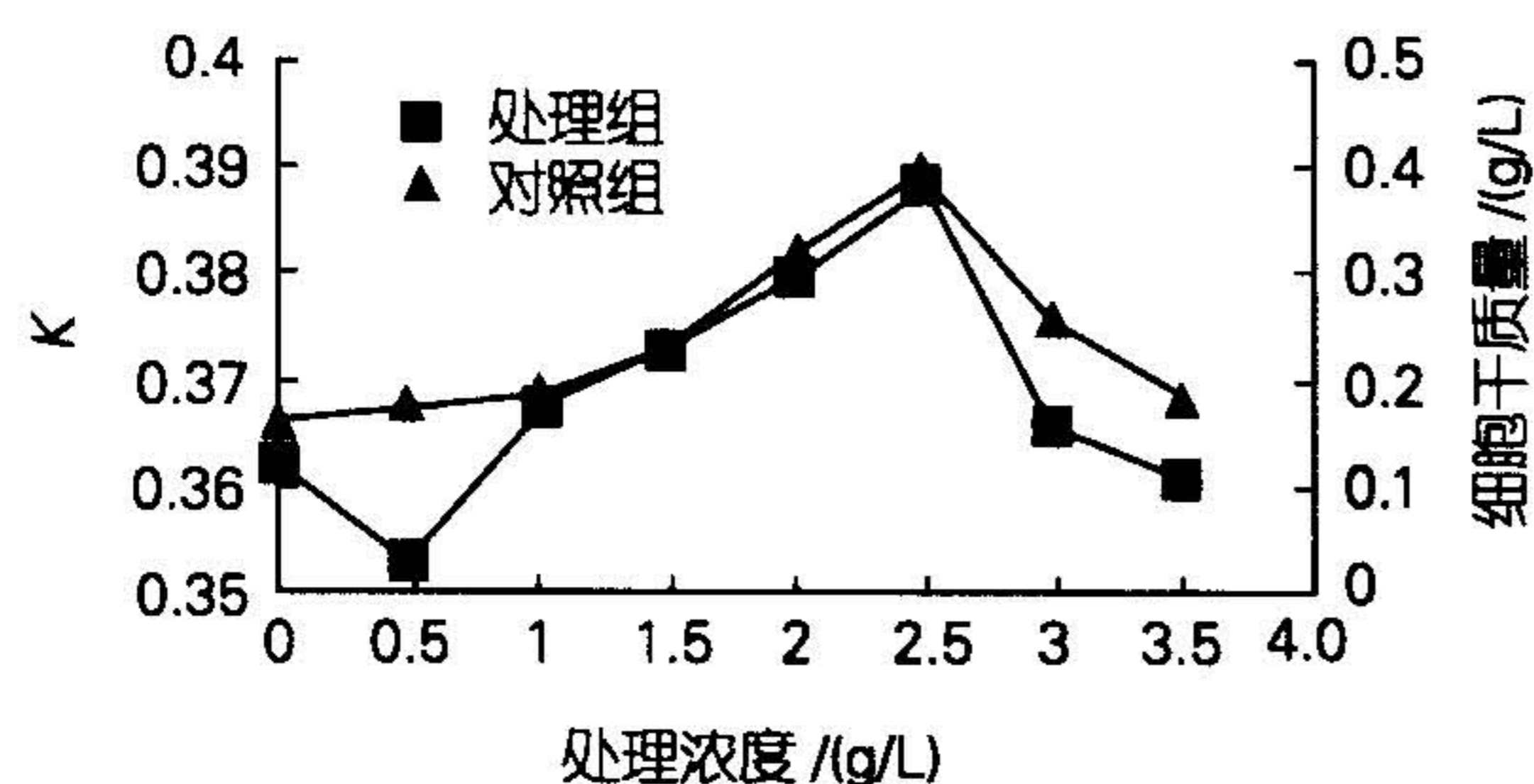


图 2 NTG 对雨生红球藻生长和干物质积累的影响
Fig. 2 Effect of NTG on growth and dry weight of *H. pluvialis*

2.3 不同 NTG 处理对雨生红球藻虾青素积累的影响

扩养后的虾青素测定结果如图 3。由图 3 可见，除 0.5 g/L 浓度处理的虾青素含量稍低于对照组外，

其它浓度的 NTG 诱变后，雨生红球藻的虾青素积累均有不同程度的提高，当 NTG 浓度为 2.5 g/L 时，虾青素的积累量达最大(1.869 75 mg/L)。对所得数据进行方差分析，得 $F = 4.21 > F_{0.05}(7, 8) = 3.5$ ，证明 NTG 处理对雨生红球藻的虾青素积累具显著的影响。

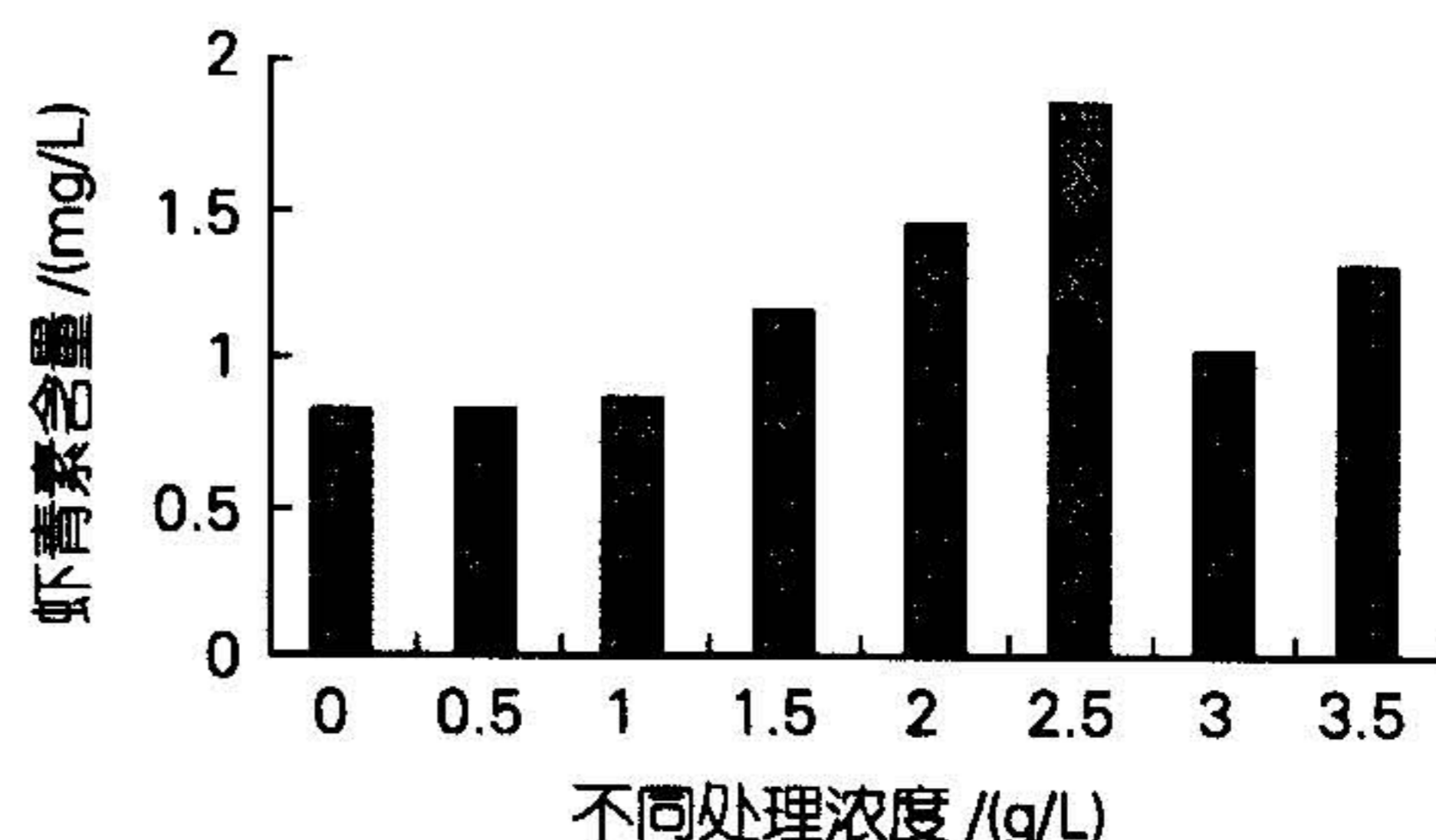


图 3 NTG 对雨生红球藻虾青素积累的影响
Fig. 3 Effect of NTG on the saxanthin accumulation of *H. pluvialis*

3 讨论

(1) NTG 在处理其它藻或菌时，选用的浓度较低，如吴江等^[11]用 0.2 和 0.4g/L 的浓度诱变出产虾青素产量高的菌株；殷春涛等^[12]用 0.1g/L 的 NTG 诱变筛选出较耐低温的螺旋藻品系。而本实验中采用的 NTG 浓度要高于处理其它藻所用的浓度，究其原因可能与藻体内含有的虾青素有关，虾青素所具有的强抗氧化能力提高了它对外界环境的抗性。在多次预备实验过程中，由于处理后没经暗处理，3 d 时的抑制（致死）浓度较高，后经暗处理，其抑制浓度相对较低。其原因可能是没经暗处理发生了回复突变，由于在诱变时 NTG 引起的是碱基对转换，这类突变相对较易回复，特别是光修复^[7]。

(2) 经不同浓度 NTG 处理后，藻体细胞都有一定程度的致死效应，表现在藻体细胞被漂白，并随时间的延长不再恢复活动能力，但也有一部分细胞处于活力抑制状态，其活动能力可随时间的延长而逐渐得到恢复，故在以不动细胞测其抑制率时，抑制率会随培养时间的延长而降低。

(3) NTG 作为一种高效的诱变剂，在诱变育种中已表现出一定的优越性。Fang 等^[13]用 NTG 诱变后经 β -紫罗铜筛选得到的突变株，虾青素含量可提高 2~3 倍。吴江等^[11]用 NTG 诱变红法夫酵母筛选出类胡萝卜素产量高的突变株。本实验结果发现：一定剂量的 NTG 处理不但能刺激雨生红球藻的生长，而且还可以促进藻液中虾青素的积

累,浓度为 2.5 mg/L 的 NTG 处理效果最好,表现在其生长 *K* 值,藻液干质量和虾青素积累量都最大。根据育种实践经验,致死率为 70%~80% 的诱变剂量有利于正突变的产生^[14]。本实验结果与该结论一致。而以往的研究认为雨生红球藻一般在生长不良,生长停滞时才开始积累虾青素,并逐渐由绿色转变成红色的厚壁孢子。即该藻的生长和虾青素积累往往是矛盾的,而本实验的诱变结果表明该藻生长和虾青素积累趋于同步,NTG 的作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘子怡,沈奇桂. 虾青素的生物活性及开发应用前景[J]. 中国海洋药物, 1997(3): 46-49.
- [2] Grung M D, Souza F M L, Borowitzka M, et al. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3 S') - astaxanthin esters[J]. *J Appl Phycol*, 1992(4): 165-171.
- [3] 孙伟,王晓东. 微藻产品的经济价值及开发潜力[J]. 中国海洋药物, 1995, 77(2): 48-52.
- [4] 魏东,严小君. 天然虾青素的超级抗氧化活性及其应用[J]. 中国海洋药物, 2001, 83(4): 45-50.
- [5] Kranzfelder J A. Carotenoids from microalgae[J]. *J Phycol*, 1992, 28(suppl): 11.
- [6] 蔡旭. 植物遗传育种学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1988. 536-573.
- [7] 徐学明,金征宇,吕玉华. 虾青素高产突变株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(6): 22-27.
- [8] 金传荫,宋立荣,刘永定,等. 红球藻水生 748 株营养需求的研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(3): 293-296.
- [9] Boussia S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32(7): 1 077-1 082.
- [10] Davies B H. Carotenoids[A]. Goodwin T W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments[M]. London: Academic Press, 1976. 2 38-165.
- [11] 吴江,刘子怡,朱寿民. 烷化剂 NTG 诱变虾青素产生菌红法夫酵母的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 33-37.
- [12] 殷春涛,胡鸿均,李夜光. 耐低温螺旋藻品系的筛选[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(3): 250-254.
- [13] 朱明军,林炜铁,吴海珍. 红色发夫酸母产虾青素研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(2): 70-74.
- [14] 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(自然科学版), 2001, 17(3): 76-79.

Mutagenic effects of NTG on *Haematococcus pluvialis*

LU Kai-xing, JIANG Xia-min, ZHAI Xing-wen

(Life Sciences and Bioengineering College, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Dec., 16, 2002

Key words: *Haematococcus pluvialis*; NTG; inhibiting percentage; mutagenic effect

Abstract: After treated with NTG at concentration of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5 g/L, *Haematococcus pluvialis* were collected and inoculated in Erlenmeyer flask at volumes 100 mL. Fatality rate was calculated at three days of inoculation. The incipient concentration of 5 000 cell/mL, inoculated in Erlenmeyer flasks of volume 100 mL and then cultivated in the optimal conditions: temperature 22 °C ± 3 °C, light intensity 3 800 lx, light and dark cycle 12 : 12 each concentration were cultured in 2 bottles. After ten days of inoculation, biomass and growth rate were calculated by cell counts, dry weight was measured, and astaxanthin amount was detected with a spectrometer. Results show, growth rate, dry weight and astaxanthin amount were highest at a concentration of 2.5 g/L but algae growth declined with increasing concentrations.

(本文编辑:张培新)