

微藻基因诱变研究及应用进展

杨端鹏¹, 李仲先¹, 王胜男¹, 牛建峰³, 王广策³, 李 健^{1,2}

(1. 攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000; 2. 攀枝花市格萨拉生物技术有限公司, 四川 攀枝花 617000; 3. 中国科学研究院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 微藻是单细胞小型光合生物, 是自然界最重要的初级生产者, 在食品、能源、医药和环境等行业领域有重要应用。微藻生物技术产业发展所需要的优良微藻株系, 除了通过筛选获得外, 还可以利用基因诱变或者基因工程等方法获得。利用基因诱变方法获得的突变株, 不是转基因作物, 且具有更适宜生产需要的优良性状。本文主要综述基因诱变在微藻育种中最新的应用研究进展, 为微藻产业化研发工作提供参考。

关键词: 微藻; 基因诱变育种; 突变株筛选; 高附加值产品

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2021)11-0165-14

DOI: 10.11759/hyxx20201103001

微藻是初级生产者, 能够通过光合作用吸收二氧化碳, 释放氧气, 在生态系统中有举足轻重的地位。微藻在形态上主要以单细胞或简单的多细胞形式存在, 主要包括蓝藻、绿藻和硅藻等^[1]。某些微藻在特殊条件下能够生产氢气、脂类等, 是有效的新能源生产者, 具有巨大的潜在研究利用价值^[2-3]。同时, 微藻在污水处理^[4]、二氧化碳吸收^[5]及重金属污染治理^[6]方面也有良好效果。一些微藻经过基因工程改造可以作为良好的细胞工厂, 用于生产高附加值产品, 如用于药品的植物次生代谢产物和植物源病毒抗体等^[7]。微藻含有丰富的蛋白质、维生素和微量元素, 可以用作鱼类饲料、食品、保健品和药品等产品的原料^[8]。

目前已经实现大规模产业化生产的经济微藻有螺旋藻、小球藻、杜氏盐藻和雨生红球藻等。螺旋藻主要用于水产动物饲料和保健品, 主要生产地是我国福建、江西、海南和内蒙古等地区^[9]。日本、美国、前苏联等国家率先开发小球藻作为单细胞蛋白, 其后日本将小球藻开发为食品、健康及美容产品系列。此外小球藻还在环境污染治理中, 发挥着重要作用。中国在 20 世纪 60 年代初展开了对小球藻的研究和开发利用, 但未能持续, 目前大规模生产企业较少, 与国外养殖水平差距较大^[10-11]。杜氏盐藻在食品、医药保健以及化工和养殖业中具有独特经济价值。这种藻类在澳大利亚、美国和以色列等国家已经实现了工业化生产。其产业化所涉及方面主要

是 β -胡萝卜素类保健品、化妆品、营养补充剂和藻粉等^[12]。内蒙古兰太实业有限公司已生产大量藻粉投入市场^[13]。雨生红球藻能生产具有极强抗氧化能力的天然虾青素, 可广泛运用于食品、药品、化妆品及动物饲料中。2010 年我国已批准雨生红球藻为新资源食品^[14]。2017 年虾青素全球市场价值为 5.5 亿美元, 并且以每年 8% 的速度增长, 预计到 2022 年产值能达到 8 亿美元, 有较好的产业化前景^[15]。

微藻在人类生产生活的各个领域发挥着越来越重要的作用。为了开发更加适合特殊领域需求的微藻种株, 有必要通过一定的手段进行种质资源的培育, 从而得到用于产业化的工程藻类^[16]。微藻多采用无性繁殖手段进行繁殖, 因此不能像传统农作物那样进行杂交育种^[17]。通过人工手段增加微藻的基因突变几率并通过有效手段进行人工筛选, 可以得到特定性状的藻种, 这种方法成为基因诱变育种。

收稿日期: 2020-11-03; 修回日期: 2021-01-05

基金项目: 攀枝花市重点科技项目(2018CY-N-5); 四川省科技厅重点科技计划项目(2019YFN0121); 四川大学攀枝花市产业联合创新基金项目(2019CDPZH-19); 四川省留学归国人员创业启动计划项目[Foundation: Panzhihua key technology project(2018CY-N-5); Key science and technology project of Sichuan Science and Technology Department(2019YFN0121); Panzhihua Industrial Joint Innovation Fund project of Sichuan University(2019CDPZH-19); Start-up plan of Returned Overseas Students in Sichuan Province]

作者简介: 杨端鹏(1984—), 男, 四川西昌人, 博士, 讲师, 主要从事微藻生物技术研究, E-mail: Yangduanpeng@pzh.edu.cn; 李健(1972—), 通信作者, 吉林长春人, 博士, 副教授, 主要从事微藻生物技术研究, E-mail: lij@pzh.edu.cn

基因诱变育种的诱变方式主要包括物理诱变和化学诱变,其原理是通过物理或者化学的手段,增加细胞中基因突变的概率,通过设置特定的条件进行筛选,最终获得具有优良性状的藻种,用于研究和生产实践^[1]。此外常用的藻种改良方法还包括传统的品种选育技术、基因工程技术^[18]以及合成生物学技术等^[19]。采用人工育种技术改良藻种,对于选育特定性状藻种,适用于不同生产需要,有重要的意义^[20-21]。

基因诱变育种相对于其他的育种方法有很大的技术优势。首先基因诱变方法产生的藻种不属于转基因植物^[17],不受到转基因植物的种植和运用限制。由于转基因植物存在对环境和生态的潜在威胁^[22-23],各个国家和地区出对转基因植物的大规模种植和使用作出了限制^[24]。基因工程育种产生的藻种属于转基因植物,其大规模生产及产品的运用受较大影响^[25]。基因诱变是通过人工手段增加了基因的突变频率,这种突变是自然界中普遍存在的,只是人为增加了频率,没有引入其他物种的基因和报告基因序列,其筛选过程也只是将具有特定性状的藻种从众多突变体中选择出来。基因诱变过程完全模拟自然突变和自然选择,因此不属于转基因植物^[17]。人工诱变所需设备简单,操作容易,对实验室经费要求和人员操作要求不高。相较于基因工程和合成生物学等方法,适用的范围广,对藻种没有严格限制,不需要对其遗传背景深入研究,周期短,容易产生突变株。

基因诱变方法也存在一定挑战,一是如何选择适当的筛选方法和筛选平台以保证符合目标的优良藻株被选择出来;二是诱变是随机的,需要大量的样本才能筛选到符合要求的藻种,对于实验样本量有一定要求。尽管如此,基因诱变的方法以及其在微藻育种中的实际运用近年均发展迅速,为此,本文对其进行综述,以期对微藻产业化开发工作提供参考和研发思路。

1 基因诱变方法

物理诱变选育微藻通常使用紫外线、常压室温等离子体、激光、X射线、 γ 射线、微波和离子注入等方法^[26]。紫外线诱变具有诱变效应高,设备简单、操作安全简便的特点。此技术是运用紫外光诱变的手段去改造生物遗传信息,改变微藻性状,进而选育高活性或高代谢效率,同时还具有抗逆性等的优良遗传性状藻种^[27-28]。常压室温等离子体诱变

技术主要运用等离子体活性粒子作用于微生物,能够使微生物细胞膜结构及通透性改变,引起基因损伤,进而使微生物基因序列及代谢网络发生显著变化,最终导致突变^[29]。激光辐射可以引起细胞DNA或RNA、质粒、染色体畸变效应、酶的激活或钝化,以及细胞分裂和细胞代谢活动的改变,这是激光诱变育种的基本原理。常用的诱变育种方法还包括X射线和 γ 射线辐照法,这2种射线可以引起DNA链断裂,当修复不能恢复到原状时就会出现突变^[30]。

曹媛媛等^[31]研究了紫外线(UV)及 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线对钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)的诱变效应,结果表明, $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线对钝顶节旋藻A9菌株的损伤比UV造成的损伤强烈,具有更大的诱变效应。Ermavitalini等^[32]研究了 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 对微拟球藻脂类的影响,结果表明, $^{60}\text{Co-}\gamma$ 处理后微拟球藻脂类发生了变化,其中以10 Gy辐照后微拟球藻脂类百分含量最高,达到62.65%,并且其脂肪酸种类比野生型多了3种(野生型脂肪酸种类为6种)。

化学诱变育种是用化学诱变剂处理微藻,以诱发遗传物质的突变,从而引起生理特征的变异,然后根据育种目标对这些变异进行鉴定、培育和选择,最终育成新品种^[33-34]。常用化学诱变剂的种类有烷化剂和核酸碱基类似物等。化学诱变只需少量的药剂和简单的设备,而且不同药剂对不同植物、不同组织或细胞、不同染色体节段、不同基因的诱变有一定专一性,因此广泛应用于微藻育种中,并且取得了一定的成效^[34-36]。甲基磺酸乙酯(EMS)是一种可以作用于DNA的烷化剂,分子式为 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$,分子量为124.16,溶于醇,微溶于水。这种烷化剂带有活性烷基,能够与电子密度高的碱基发生烷化作用,用烷基置换碱基上的氢原子,从而改变DNA碱基间氢键的能力,最终改变DNA结构。具体效果是在DNA的鸟嘌呤N-7位置上,H离子被烷基取代,成为带正电荷的季铵基团,进而引发转换型突变和置换型突变。转换型突变,即烷化后的鸟嘌呤不再与胞嘧啶配对而与胸腺嘧啶配对,再后续复制过程中由GC碱基对转换为AT碱基对,这种突变方式占多数;置换型,即烷基化的鸟嘌呤由于糖苷键断裂造成脱嘌呤,DNA进一步复制时由随机碱基填补^[37-38]。与此同时,EMS诱变还有较小概率造成染色体断裂,从而产生突变^[39]。

Cock等^[40]采用紫外诱变和EMS诱变两种策略处理水云属褐藻,并通过基因组测序手段检测诱变

后的突变数量、种类和分布情况。结果表明紫外诱变比 EMS 能产生更多的基因突变。紫外诱变的诱变频率为 2.67×10^{-6} , 而 EMS 诱变的频率为 7.72×10^{-7} 。这两种方法产生的主要突变为 SNPs。Kawaroe 等^[41]研究了不同浓度(对照, 0.1 mol/L, 0.5 mol/L)EMS 处理对微拟球藻的作用, 发现 0.5 mol/L EMS 处理能得到最高的生长密度, 0.1 mol/L 处理的最高的生长速度, 0.5 mol/L 处理还产生最高的 RNA/DNA 比例(0.55, 野生型的这一数值为 0.12)。

烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝胍(MNNG)是一种常用的化学诱变剂, MNNG 诱发的基因突变主要为碱基的置换和碱基的颠换。用体外 DNA 复制技术证明突变发生基础是由于化学诱变剂引发细胞 DNA 复制保真度的下降, 而细胞错配修复功能未发现异常, 但 DNA 聚合酶谱发生改变^[42]。细胞信号转导通路的激活参与了突变的发生^[43]。

核酸分子碱基类似物包括 5-溴尿嘧啶, 5-溴去氧尿核苷, 马来酰肼, 2-氨基嘌呤等, 其诱变原理是这些分子与核酸中的碱基结构类似, 它们渗入后, 在 DNA 复制过程中替代碱基的位置, 从而引起碱基的错配, 进而导致转录和翻译过程的变化, 形成突变表型。这种类型的诱变剂在藻类诱变育种中的运用较少, 常见于植物诱变育种^[16]。

李勇斌等^[44]运用化学诱变剂 MNNG 处理坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)原生质体, 观察不同剂量的诱变剂对体细胞生长分裂速度和发育分化方向的影响。结果显示: 不同剂量的 MNNG[(7.5~120.0)μg/mL]对坛紫菜体细胞的生长都有明显的抑制作用, 而且会影响坛紫菜体细胞的发育分化方向。7.5 μg/mL、15.0 μg/mL 诱变处理组向畸形细胞团和丝状体发育; 30.0 μg/mL 和 60.0 μg/mL 诱变处理组向团型叶片发育; 120.0 μg/mL 诱变处理组后期多发育为正常型叶片。邹立红等^[45]利用化学诱变剂 MNNG 处理海洋单细胞绿藻卡德藻, 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。

2 筛选平台选择

由于诱变育种具有高效率、随机突变的特点, 如何在大量的突变体中筛选出具有应用价值的藻株显

得尤为重要^[17, 46]。合理的筛选平台需要具备以下特点:

- 1) 高通量。能在短时间内进行基数较大的筛选, 从而将极小概率的目标突变株筛选出来, 进行扩大培养。
- 2) 具有明显的筛选标记。筛选目标的特性是确定筛选标记的主要方法, 任何一个筛选平台, 必须要有一个明确的筛选标记, 以便从大量的藻类中分离出目标藻株。这种筛选标记可以是自然存在的, 比如抗逆性、抗药性或其他理化特性; 也可以是人工添加的, 比如染料染色和报告基因等。
- 3) 专一性。筛选得到的突变株必须是单一的克隆, 从而保证突变性状统一。

筛选方法中最常见、最方便使用的一类就是通过藻株的生物学特征进行筛选, 比如在胁迫下通过其生物量或者克隆大小来确定突变体^[35, 47-48]。检测生物量通常采用细胞计数法和分光光度计检测, 其中分光光度计检测方法速度快, 通量较高。利用颜色特性(变绿、变黄或变红)来对突变体进行筛选^[49-51]也是一种常用的方法, 可以选择得到与色素合成相关表型的突变体。利用叶绿素荧光仪检测光合系统参数, 通过分析筛选得到突变体的方法也越来越多被采用^[52-53]。这种方法利用了突变株与野生型间表型特征的不同, 采用相应的手段, 直接将特定的突变体从众多细胞株中选出来, 简单易行, 不需要预处理, 对细胞伤害较小。其通量的大小由采用的方法和仪器检测效率决定。

另一类方法就是在筛选培养基中加入相应代谢过程抑制物, 在这种平板上仍能生长的藻株通常在该代谢过程能得到更多产物。该方法多用于筛选虾青素合成^[54]和脂类合成^[55]的藻株。常用的抑制物一类是除草剂, 如喹啉、草铵磷和达灭草等。研究表明除草剂通常是植物某个代谢过程关键酶的抑制剂, 除草剂的添加会抑制相应的代谢过程, 使正常型植株无法生长, 而该代谢过程发生突变的个体, 能够存活下来。存活下来的个体在正常培养条件下, 该过程的代谢产物合成会增加, 例如草铵磷能阻断谷氨酰胺合成酶的活性, 抑制红球藻的生长并增加其虾青素的积累^[56]。另外一类是抗生素浅蓝菌素或红霉素^[57]等。浅蓝菌素是脂肪酸合成酶一个负责催化脂肪酸链 C14 延长的亚型的抑制剂, 在浅蓝菌素处理下生长起来的突变体, 在正常环境中能产生更多的脂肪酸^[57]。化学试剂 β-紫罗酮、二苯胺^[54]、烟碱等也是常用于筛选用的抑制物。Chumpolkulwong 等^[58]通过研究表明筛选得到耐受二苯胺(DPA)的突变株能使法夫酵母积累两倍的虾青素。

第三类筛选方法是在诱变后的藻株中加入染色剂或荧光标记,再采用相应检测手段进行高通量筛选,从而得到富含某类代谢产物的藻株。例如尼罗红荧光染料能与藻类中的代谢产物中的脂类结合,从而使脂类含量较高的藻类荧光值较高,从而被能识别荧光信号的流式细胞仪分选出来^[59-60]。根据研究的需要可以选取不同的染色剂达到最佳效果^[61-62]。

近年来,由于高通量测序技术的快速发展,诱变后采用测序技术进行检测能够得到诱变频率及产生的诱变种类的信息^[40],有助于加深对诱变机理和效率的理解和认识。代谢组学的方法也可运用于突变体的筛选^[63]。随着检测技术的发展,将会出现越来越多的筛选平台,助力基因诱变后的筛选。

3 微藻基因诱变研究进展

3.1 诱变提高油脂含量

能源紧缺问题是人类社会的发展过程中遇到的问题,生物柴油作为一种新兴的可再生能源,越来越受到人们的重视。由于微藻的生物学特性,相比植物更容易大规模工业化培养来生产生物柴油。通过诱变获得高产藻株对微藻生物柴油的下游生产具有重要意义^[64]。诱变育种提高油脂含量研究的具体案例见表1。

Zayadan 等^[65]采用紫外诱变处理蛋白核小球藻,获得脂类合成和积累量提高的突变株 C-2m2,并确定其脂类积累量在培养基中氮元素含量为原培养基 1/10,光照为 4 klx 时最高。Liu 等^[66]采用紫外诱变(UV)小球藻,采用选取绿色悬浮藻培养物方式筛选,得到突变株比野生型生长速度快 7.6%,在 15 d 其脂类含量增加到体积的 28.1%。Muthurai 等^[67]采用高能紫外诱变小球藻 FC2 IITG,在缺氮条件下,通过尼罗红染色筛选富含油脂的突变体,得到突变体 FC2-25UV,其中性脂含量比野生型高 48.4%。Tanadul 等^[55]利用 EMS 诱变处理小球藻,之后采用添加除草剂喹禾灵(quizalofop)的培养基进行筛选,得到生物量及脂类产量高于野生型的突变株 3 株,其中最高突变株脂类产量比野生型增加 53%。卫治金等^[68]对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)进行低温等离子体诱变,之后测定培养期间小球藻的生物量、总脂含量及脂肪酸组成等指标,从中筛选生长速度快、油脂含量高的小球藻突变株。诱变筛选得到 3 株油脂含量高的藻株,其中诱变株 M1 的总脂含

量、中性脂含量、总脂产率及中性脂产率分别较野生株分别提高了 103.5%、133.5%、163.7%和 202.9%。李青等^[69]对若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*)进行紫外诱变,尼罗红染色后再利用流式细胞仪对高含油藻株进行筛选。最终筛选到的藻株 S16 经培养总脂产量达到 2.4 g/L,比野生对照株提高了 50%。刘长斌等^[52]采用紫外诱变小球藻,并采用尼罗红染色荧光与叶绿素荧光比值表征小球藻的油脂含量,作为筛选方法筛选得到诱变株 M2,其总油脂含量 32.1%,高于野生藻株的 23.1%。刘秀花等^[70]采用等离子束诱变对小球藻进行诱变处理,通过荧光分光光度法对诱变菌株进行初筛,再通过苏丹黑染色观察、尼罗红染色和酸热解法提取油脂等进行复筛,得到高产油量突变株 45s2-14,产油量达到 7.07×10^{-2} g/mL,45s2-1 单位鲜菌体产油量达到 26.9%。周玉娇等^[28]利用紫外诱变技术,对海南本地淡水水域筛选得到的小球藻 Y019 进行诱变,得到 1100 株诱变株。以 HSM 培养基和 HSM 氮缺乏培养基分别进行筛选,筛选出 M37 和 M67 两个高含油量株系。与野生型小球藻 Y019 相比,其相对生长速率没有明显变化,油脂含量分别提高了 24.58%、17.88%,表明紫外诱变在对野生藻种改良上具有较好作用。胡小文等^[71]采用紫外诱变处理小球藻株 La4-37,利用尼罗红荧光检测法对获得的藻株进行荧光检测,筛选获得相对含油量最大的诱变藻株 M077 和 M040。诱变株生长周期和油脂积累时期基本一样,当达到平稳期时脂荧光强度分别是原始藻株的 6.2 倍和 1.7 倍。Vigeolas 等^[72]利用紫外辐照诱变小球藻,采用尼罗红染色后进行大规模筛选,得到四株突变株,其生长速度,细胞大小与原藻种没有差异,但细胞内 TAG 与细胞干重比显著提高。

曹旭鹏等^[59]以筛选高生长速率或油脂含量高为目标,建立一种基于常压室温等离子体技术的湛江等边金藻诱变方法,并采用高温高压处理后检测生长速率和尼罗红荧光的方式进行筛选,证明了常压室温等离子体技术在微藻育种中的运用价值。陈建楠等^[73]通过紫外和等离子体诱变育种技术对球等鞭金藻进行诱变,进而采用计算生长速率及尼罗红染色方法进行筛选,得到不饱和脂肪酸含量比原始藻株提高 1.2 倍以及岩藻黄素单位含量均高于原始藻株的突变株。Lim 等^[74]利用紫外线(UV-C)诱变干扁藻(*Tetraselmis suecica*)并采用激活荧光细胞分选技

表 1 基因诱变提高突变株油脂含量

Tab. 1 Studies to improve the lipid content of mutants through mutagenesis

微藻种类	诱变方法	筛选方法	诱变结果	参考文献
蛋白核小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	紫外线, 254 nm, 4 J/m ²	平板培养, 显微镜观察筛选	突变株 C-2m2 脂类含量占细胞干重比例提高到 16%, 最高可达 32%	文献[65]
小球藻(<i>Chlorella</i> sp.)	紫外线, 253.7 nm 15 cm, 24 min	选取悬浮生长的绿色克隆	生物量较原来提高 7.6%, 脂类含量最高达到 28.1%	文献[66]
小球藻(<i>Chlorella</i> sp. 6-4)	EMS, 100~200 mol·L ⁻¹ , 30 min	含 100 μmol·L ⁻¹ 桥喹啉的平板上筛选存活株	生物量高于野生型, 脂类产量比野生型增加 53%	文献[55]
小球藻(<i>C. vulgaris</i>)	低温等离子体, 电压 40 kV、电流 2 A, 4 min	浓绿色生长良好克隆, 检测脂类含量筛选	突变株 M1 总脂含量较野生型提高 103.5%	文献[68]
若夫小球藻(<i>Chlorella zofingensis</i>)	20 W 紫外灯, 15 cm, 40 min	尼罗红染色, 流式细胞仪分选	突变株 S16 总脂含量比野生型提高 50%	文献[69]
小球藻(<i>Chlorella sorokiniana</i>)	30 W 紫外灯, 30 cm, 15 min	液体培养, 检测脂类含量筛选	突变株 M2 总油脂含量由野生型的 23.1%提高到 32.1%	文献[52]
小球藻(<i>Chlorella</i> sp.)	等离子束诱变, 12 SLM, 5 mm, 45 s	尼罗红荧光染色, 荧光分光光度计检测	突变株 45s2-1 单位鲜藻体产油量达到 26.9%	文献[70]
小球藻(<i>Chlorella vulgaris</i>)	18 W 紫外灯, 40 cm, 13 min	选取个体大、颜色浓绿克隆进行脂类检测选择	M37 和 M67 油脂含量分别提高了 24.58%、17.88%	文献[28]
小球藻(<i>Chlorella sorokiniana</i>)	30 W 紫外灯, 10 cm, 60 s	尼罗红染色, 酶标仪选荧光强度高	M077 和 M040 脂类积累大幅提高, 荧光强度为野生型 6.2 倍和 1.7 倍	文献[71]
小球藻(<i>Chlorella sorokiniana</i>)	紫外线 254 nm, 15 W, 34 cm, 30 min	尼罗红染色, 荧光检测	得到 4 株细胞内 TAG 与细胞干重比野生型显著提高的突变株	文献[72]
湛江等鞭金藻 (<i>Isochrysis zhangjiangensis</i>)	常压室温等离子体, 35 V, 1.1~1.5 A, 2~3 mm, 24~30 s	尼罗红染色, 荧光值筛选	获得 5 株油脂含量高的突变株	文献[59]
球等金边藻(<i>Isochrysis galbana</i>)	等离子体诱变箱, 252~288 s	挑选长势较好的克隆, 尼罗红染色筛选	得到 6 株不饱和脂肪酸较高的突变株	文献[73]
干扁藻(<i>Tetraselmis suecica</i>)	紫外线(26 mJ、92 ml)	激活荧光细胞分选技术和微滴定盘细胞密度检测手段筛选	M5 和 M24, 其中中性脂含量比分别为野生型的 114% 和 123%	文献[74]
等边金藻 (<i>Isochrysis Affinis Galbana</i>)	紫外线 254 nm, 13.5 cm, 32 min	尼罗红染色, 流式细胞仪筛选	S2M2 中性脂类较野生型增加 80%	文献[60]
微拟球藻(<i>Nannochloropsis</i> sp.)	EMS (0.24, 0.42, 0.63 mol·L ⁻¹), UV 245 nm, 5~240 s	氟硼二吡咯染色, 然后根据荧光进行筛选	突变体的脂类是野生型 3 倍, 但总的生物量有所下降	文献[61]
微拟球藻(<i>Nannochloropsis</i> sp.)	EMS (0.1, 0.5, 1, 1.2 mol·L ⁻¹), 1 h	绿色细胞染料染色, 流式细胞术分选	突变体总脂脂肪酸含量是野生的 4 倍, 软脂酸含量增加了 30%	文献[62]
海洋微拟球藻 (<i>Nannochloropsis oceanica</i>)	亚硝基胍(NTG)诱变	亲脂性荧光染料染色后流式细胞仪筛选	MT-4 油脂积累达到干重的 66%, 油脂产率比野生型藻株提高 45%	文献[75]
微拟球藻(<i>N. oceanica</i>)	碳离子束辐照, 31 keV·μm ⁻¹ , 80 Gy	Imaging-PAM 和酶标仪, 最大光合效率, OD ₇₅₀ 值提高 10%	(HP-1 和 HP-2)生物量大幅提高, 两株藻产油率分别为野生型藻株的 119%和 111%	文献[53]

注: 紫外线诱变中距离为灯到样品距离, 时间为处理时间。

术和微滴定盘细胞密度检测手段筛选脂类含量增加而非细胞生长量增加的突变体。最终筛选出两株突变体 M5 和 M24, 其中性脂含量分别为野生型的 114% 和 123%。Bougaran 等^[60]采用紫外诱变(UVc)结合尼罗红染色、流式细胞筛选方法筛选高脂类含量等边金藻突变体, 结果获得生长速率不变, 中性脂类含量增加 80%的突变株。Beacham 等^[61]利用 EMS 诱变微拟球藻 CCAP849/3 后对其中性脂用氟硼二吡咯染色, 然后根据荧光进行筛选, 得到了多不饱和脂肪酸含量和总脂肪酸甲酯含量为野生型含量的 156% 的藻株。之后, 再对突变体采用 UV 诱变, 得到脂类是野生型 3 倍的突变株, 但总的生物量有所下降。Doan 等^[62]利用 EMS 对微拟球藻进行处理, 利用绿色细胞染料(SYTOX Green cell stain)对细胞进行染色, 再采用流式细胞术对细胞进行分选, 获得脂类含量增加的突变体。突变体的总脂肪酸含量是野生型的 4 倍, 其中软脂酸含量增加了 30%, 二十五碳五

烯酸含量减少了 45%。何文栋等^[75]采用 NTG 诱变微拟球藻, 采用亲脂性荧光染料 BODIPY505/515 染色后流式细胞仪筛选, 得到 4 株候选富油藻株(MT-1, 2, 3, 4)。4 株诱变株产油性能较野生株有较大提高, 其中 MT-4 油脂积累达到了干重的 66%, 油脂产率比野生型藻株提高了 45%。4 株诱变株的脂肪酸 C16 和 C18 之和占 78%以上, 且主要以饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸为主; 多不饱和脂肪酸只占总脂肪酸的 6%~8%, 非常适合生物柴油生产。王芝瑶等^[53]采用碳重离子对微拟球藻株(*Nannochloropsis oceanica* OZ-1)进行诱变, 然后采用 Imaging-PAM 和酶标仪进行大规模筛选, 获得两株高生长速率微拟球藻突变藻株(HP-1 和 HP-2)。两株突变藻株(HP-1 和 HP-2)生物量积累较野生型藻株大幅提高, 在 18 d 培养末期生物量分别提高了 18%和 26%。两株突变藻株油脂产率分别为 295 mg/(L·d)和 275 mg/(L·d), 而野生型藻株为 247 mg/(L·d)。

表 2 基因诱变增加突变株生物量

Tab. 2 Studies to increase the biomass of mutants through mutagenesis

微藻种类	诱变方法	筛选方法	诱变结果	参考文献
小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)	紫外线(30 W 紫外灯, 20 cm, 60 s)	含 1 200 mg/L 碳酸氢铵的 BBM 平板筛选	在高 NH_4HCO_3 浓度下, 突变株 B4 和 C6 的生物量比出发藻株提高近 30%	文献[76]
栅藻(<i>Scenedesmus</i> sp.)	紫外线 253.7 nm, 3.4 W·m ⁻²	平板选择大的克隆, 后进行脂类含量检测	突变株比野生型的脂类含量提高了 3 倍	文献[77]
微拟球藻(<i>N. oceanica</i>)	重金属离子, 31 keV·μm ⁻¹ , 160 Gy	平板培养挑选克隆后进行筛选	突变体 HP-1 生物量和最大生长速率分别比野生型提高了 19%和 6%	文献[78]
聚胞藻 (<i>Synechocystis</i> PCC 6803)	EMS, 1.18 mol·L ⁻¹ , 1 h	平板培养, 选择墨绿色生长较大克隆	突变株 D1 比野生型碳水化合物合成增加 46%, 脂类合成增加 64%	文献[49]
沙漠微藻 (<i>Desmodesmus</i> sp.)	EMS, 0.6~0.8 mol·L ⁻¹ , 1 h	尼罗红染色后 96 孔板内检测荧光筛选	S5 生物量和脂类产量比野生型高出 45.50%, 74.24%	文献[79]
微拟球藻 (<i>Nannochloropsis</i> sp.)	EMS, 50 μL·mL ⁻¹ , 20 min	平板培养选生长速度快的克隆	得到的突变体生物量比野生型提高了 25%	文献[48]

3.2 诱变提高生长速率

微藻应用于高附加值产品的生产及环境治理时需要微藻有较高的生长速率, 较高的生长速率对应着更高的产出及更低的时间成本, 因此通过诱变获得具有高生长速率的藻株具有重要意义。表 2 列举了诱变育种提高微藻生长速率的研究。

曹晓菲等^[76]利用紫外线诱变小球藻, 然后用高浓度 NH_4HCO_3 作为筛选压力对其进行筛选。由此获得的小球藻突变株 B4 和 C6, 在高 NH_4HCO_3 浓度下, 生物量比野生藻株提高近 30%; 对比野生藻株, B4

和 C6 的最大光能转化效率有显著提高。Sivaramakrishnan 等^[77]采用紫外线诱变栅藻后, 按平板上克隆大小筛选得到生物量(1.9~2.4 g/L 干质量)和脂类含量(40%~50%)分别比野生型提高的藻株, 再采用双氧水处理, 结果突变株比野生型的脂类含量提高了 3 倍。Ma 等^[78]采用重金属离子诱变微拟球藻, 得到突变体 HP-1, 其生物量和最大生长速率分别比野生型提高了 19%和 6%, 脂类产量提高了 8%。Patel 等^[49]采用诱变剂 EMS 处理野生型聚胞藻 6803, 筛选高生长速率、高碳水化合物、高脂类产量的突变藻株。突变

株由诱变后存活藻株平板培养后形态学观察(黑绿色及变大的克隆)得到。从中筛选出高生长速率突变株 D1 和 D8, 与野生型相比其碳水化合物合成增加 46%, 脂类合成增加 64%; D8 突变株脂类产量比野生型增加 82%。Zhang 等^[79]采用诱变剂 EMS 处理沙漠微藻 *Desmodesmus* sp. 获得两株突变藻 S5 和 G3, 其生长速率和脂类含量都明显高于野生型。突变体筛选采用尼罗红染色, 在 96 孔板中采用微孔板光谱分析仪(spectra max M5 microplate reader)进行检测。S5 与 G3 的生物量和脂类产量比野生型分别高出 45.50%, 74.24%和 20.67%, 55.77%。Anandarajah 等^[48]使用诱变剂 EMS 处

理微拟球藻, 之后在平板培养中选择生长速度快的克隆, 得到的突变体在 $300 \mu\text{m photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下生物量比野生型提高了 25%。

3.3 诱变增强抗逆性

具有抗逆性的藻株一般对环境的变化具有更强的耐受性, 在不利或胁迫环境下其生理生化受到的影响较小, 甚至能够在特殊环境下生长; 同时一些特殊环境, 如高温还可能提高某些代谢物的产量。因此通过诱变获得抗逆性增强的藻株, 也是突变株定向筛选的一个方向。表 3 列举了诱变育种增强抗逆性的研究。

表 3 基因诱变增强突变株抗逆性

Tab. 3 Mutagenesis increases stress resistance

微藻种类	诱变方法	筛选方法	诱变结果	参考文献
蛋白核小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	EMS, 1.75%, 2%	接种到液体培养基中, 在高温下培养, 测量 OD ₇₅₀ 筛选	M18 和 M24 具有耐高温特性, 且脂类产量较 30 °C 下野生型分别增加 59.62%和 50.75%	文献[47]
小球藻 (<i>Chlorella</i> sp.)	EMS, 100 mmol·L ⁻¹ , 1 h	平板在 40 °C 下培养, 测量吸光度的方法检测细胞数	MT-7 和 MT-15 生长速度 25 °C 下是野生型的 1.4 到 1.8 倍, 40 °C 下是野生型的 3.3 到 6.7 倍	文献[35]
杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	MNNG, 0.3 mg, 1 h	1 mol·L ⁻¹ NaCl 培养基上培养	得到 8 株在高渗透势培养后恢复培养中无法正常生长的突变体	文献[80]

Sachdeva 等^[47]采用 EMS 诱变方法得到两株耐高温的蛋白核小球藻突变株 M18 和 M24, 它们在 47 °C 高温下具有较高的脂类产量和较快的生物量积累。M18 和 M24 高温培养下脂类产量较 30 °C 下生长的野生型分别增加 59.62%和 50.75%, 而野生型不能在超过 35 °C 以上条件下生长。Ong 等^[35]采用 EMS 诱变小球藻并在 40 °C 高温下培养平板, 从中挑选出较大的克隆, 获得突变体 MT-7 和 MT-15。它们的生长速度在 25 °C 时为野生型的 1.4 到 1.8 倍, 在 40 °C 时为野生型的 3.3 到 6.7 倍。Chitlaru 等^[80]采用 MNNG

和紫外诱变的方法处理杜氏盐藻, 在高温渗透势的环境中筛选突变体, 得到在高温渗透势培养后恢复培养无法正常生长的突变体。

3.4 诱变增加次生代谢产物产量

微藻合成的次生代谢产物具有重要的经济价值, 提高单位质量微藻中次生代谢产物是提高高附加值产物产量、节约成本的重要手段。通过基因诱变处理微藻, 并针对性地进行筛选, 能获得次生代谢产物高产量的优良株系, 对于后续生产具有重要意义。表 4 列举了这类研究的研究情况。

表 4 基因诱变增加突变株次生代谢产物水平

Tab. 4 Mutagenesis increases the levels of secondary metabolites

微藻种类	诱变方法	筛选方法	诱变结果	参考文献
雨生红球藻 (<i>Haematococcus pluvialis</i>)	常压室温等离子诱变 100 W、2 mm、10 L·min ⁻¹ , 40 s	含有虾青素合成抑制剂(β -紫罗酮和二苯胺)的培养基上筛选	突变株 M45 的虾青素含量较出发株提高了 51.96%; 虾青素产量相比出发株提高了 61.73%	文献[54]
雨生红球藻 (<i>Haematococcus pluvialis</i>)	⁶⁰ Co- γ 4 000 Gy	高 CO ₂ 环境条件下筛选生长较快突变株	突变株在 6% CO ₂ 浓度下虾青素含量比野生型提高了 2.4 倍	文献[82]
雨生红球藻 (<i>Haematococcus pluvialis</i>)	大气压氩气介质阻挡放电技术(DBD) 15.6 kV, 选择 1.8 mA	平板培养, 根据克隆生长速度选择	得到生长速度快, 虾青素产量高的突变体	文献[83]

续表

微藻种类	诱变方法	筛选方法	诱变结果	参考文献
小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	MNNG, 0.05 g·L ⁻¹ , 1 h	40 °C 下高 CO ₂ 浓度平板培养, 筛选长出的绿色克隆	突变体中叶黄素最高产量达小球藻生物量的 80%	文献[85]
杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	EMS, 0.2 mol·L ⁻¹ , 2 h 黑暗	平板培养后根据克隆颜色筛选	突变体在低光照培养条件下细胞中玉米黄素的积累量是野生型的 30 倍	文献[50]
杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	EMS	根据克隆的颜色(黄绿色)挑选突变株	玉米黄素较野生型高 15% 的突变株	文献[51]
杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	紫外线, 30 W, 15 cm, 15~19 min	平板筛选体积较大的克隆	得到四株蛋白质和多糖显著提高的突变株	文献[87]
杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	紫外线, 30 W, 13 cm, 40~100 s	平板培养筛选橙红色藻落	得到的突变株 β-胡萝卜素含量高达干质量的 9.48%	文献[27]
微拟球藻 (<i>Nannochloropsis oculata</i>)	EMS, 100 mmol·L ⁻¹ , 60 min	有浅蓝菌素或红霉素的平板上筛选	突变株二十碳五烯酸含量分别比野生型增加了 29%	文献[57]
微拟球藻 (<i>Nannochloropsis oculata</i>)	碳重离子束, 80 Me·μ ⁻¹ , 40~200 Gy	加有三氯生的培养基上筛选	突变株 M44 二十碳五烯酸质量分数为 43.3%, EPA 质量浓度是出发藻株的 2.38 倍	文献[88]
螺旋藻 [<i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira</i>)]	等离子诱变	氨基酸分析仪测氨基酸含量	突变株 10 的总氨基酸含量最高, 比出发藻株高出 53.52%	文献[63]

吴晓英等^[54]利用常压室温等离子体技术处理雨生红球藻, 在含有虾青素合成抑制剂(β-紫罗酮和二苯胺)的培养基上筛选, 得到虾青素高产藻株 M45。突变株的生物量和生长速率分别较出发株提高了 6.45% 和 8.57%。虾青素产量比出发株提高了 61.73%。陆开形等^[81]利用叠氮钠(NaN₃)处理雨生红球藻, 采用浓度为 1 mmol/L 的 NaN₃ 处理有利于促进藻细胞的生长, 而其他浓度处理则对藻生长起抑制作用; 但不同浓度处理都有利于促进虾青素的积累。Cheng 等^[82]利用 ⁶⁰Co-γ 辐照诱变红球藻, 并在高 CO₂ 环境条件下筛选生长速度快和虾青素含量高的藻株。该突变株在通常气体环境下生长速率比野生型提高 15%, 6%; 高 CO₂ 浓度下培养的突变株其虾青素含量比野生型提高了 2.4 倍。Liu 等^[83]采用大气压氩气介质阻挡放电技术(atmospheric pressure argon dielectric barrier discharge)诱变红球藻, 根据平板中克隆的生长速度筛选, 得到生长速度快, 虾青素产量高的突变体。对突变体进行分析, 发现高虾青素含量的突变体中, 其番茄红素环化酶的活性较高, 这种酶催化了番茄红素转化为 β-胡萝卜素的过程。Wang 等^[84]采用紫外线诱变后再用 EMS 诱变的方式诱变红球藻, 之后在含有抑制剂 DPA(diphenylamine)的平板上筛选, 选择转变为红色克隆的藻株。得到突变体 DPA12-2, 其虾青素含量为野生型的 1.7 倍。

Lee 等^[85]采用 MNNG 诱变小球藻在高温及高 CO₂ 利用率条件下进行筛选, 得到具有叶黄素含量提高的突变体, 突变体中叶黄素最高产量达小球藻生物量的 80%。Cordero 等^[86]采用 MNNG 诱导小球藻随机突变, 通过在培养基中加入叶黄素合成代谢阻遏物烟碱和除草剂达灭草筛选突变株, 最终得到叶黄素含量两倍于野生型的突变株 MR16。Jin 等^[50]采用 EMS 诱变杜氏盐藻, 经培养后根据颜色筛选色素异常突变体, 得到玉米黄素环氧化作用缺失, 因而持续积累玉米黄素的突变体, 在低光照培养条件下其细胞中玉米黄素的积累量是野生型的 30 倍左右。Minjae 等^[51]利用 EMS 诱变杜氏盐藻后根据克隆的颜色(黄绿色)挑选突变株, 获得玉米黄素较野生型高 15% 的突变株, 并对其培养条件进行了研究。

王小万等^[87]利用紫外诱变杜氏盐藻, 通过平板筛选体积较大的克隆, 得到 4 株与出发株相比具有生长优势的藻株。测定了这 4 个株系的 β-胡萝卜素、蛋白质和胞外多糖含量, 结果显示, 有 2 株藻种的 β-胡萝卜素含量有显著提高, 与出发株相比分别提高了 24.8% 和 29.9%; 胞外多糖含量有所增加, 有 3 株藻种胞外多糖含量分别比出发株增加 18.60%、4.65%、9.30%; 而盐藻的蛋白质含量经紫外线照射后, 与出发株相比呈下降趋势。钟政等^[27]采用紫外线诱变杜氏盐藻, 筛选橙红色藻落继续培养, 再经高

盐、强光、低氮诱导后,检测其胡萝卜素含量。得到的突变株 11-1 具有高产 β -胡萝卜素的能力,其 β -胡萝卜素含量高达干质量的 9.48%,显著高于原出发株。

Ratnesh 等^[57]采用 EMS 诱变微拟球藻(*Nannochloropsis oculata*),然后在含有浅蓝菌素或红霉素的平板上筛选,得到的突变株其二十碳五烯酸含量分别比野生型增加了 29%和 12%。李悦明等^[88]采用重离子束辐照诱变微拟球藻,在加有三氯生的培养基上进行筛选,得到突变株 M44,其二十碳五烯酸(C20: 5, n-3, EPA)质量分数为 43.3%,EPA 质量浓度达到 2.5 g/L,是出发藻株的 2.38 倍。

谢凤行等^[89]对一株从养殖环境中筛选出的生长较快蛋白含量较高的小球藻 TX 进行了紫外诱变、EMS 诱变和紫外—化学复合诱变,采用 96 孔板高通量筛选技术和递进式重复筛选方法选育高生物量、高蛋白突变株,得到突变株 H10,其总蛋白含量、可溶性蛋白含量和干重分别较出发藻株提高 3.4%、15.8%和 26.2%。闫春宇等^[63]以螺旋藻 TJF1 为出发藻株,多功能等离子体诱变仪对藻株进行诱变处理,日立 L-8900 氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组成和含量,利用模糊识别法和氨基酸比值系数法对突变体与出发藻株的氨基酸营养价值进行评价,获得了 15 个突变株,其中的 17 种氨基酸含量均高于出发藻株,总氨基酸含量差异显著;突变株的氨基酸含量分布与出发藻株保持一致;其中总氨基酸含量最高的一株,比出发藻株高出 53.52%,可作为高产蛋白优势藻株应用。

4 总结

基因诱变育种具有设备要求不高、实验操作简单、诱变效率高和易于推广等优点^[26],还具有较好的普适性,对于物种没有明显的限制,不需要遗传背景清晰,不要求特殊的转化手段。因此,基因诱变是目前使用较多的藻种育种手段。但是,诱变育种也存在一些问题,比如靶向性不佳。诱变是随机的,需要从大量的突变和没有突变的后代中筛选具有特定性状的藻株,因此对应的大规模的筛选手段非常必要。诱变育种的遗传稳定性也有待考证,在后代培养中具有二次突变的可能性。

基因诱变育种能获得具有优良性状的突变株,有提高产量、简化培养方法、节约生产成本的潜力,从而提高产业化生产效率,增加产出,对于微藻产

业发展具有重要意义。诱变育种产生的突变株,不属于转基因生物,在其生产和运用过程中不存在限制,其产品易于推广,应该引起微藻生物技术研发工作者的高度重视。

参考文献:

- [1] 范勇,胡光荣,王丽娟,等. 微藻育种研究进展[J]. 生物学杂志, 2017, 34(2): 3-8, 35.
FAN Yong, HU Guanrong, WANG Lijuan, et al. Advances in microalgae breeding[J]. Journal of Biology, 2017, 34(2): 3-8, 35.
- [2] DAY J G, SLOCOMBEL S P, STANLEY M S. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels[J]. Bioresource Technology, 2012, 109(1): 245-251.
- [3] 李健. 微藻生物技术产业前景和研发策略分析[J]. 科学通报, 2012, 57(1): 23-31.
LI Jian. Analysis on industry prospect and R&D strategy of microalgae biotechnology[J]. Chinese science bulletin, 2012, 57(1): 23-31.
- [4] 冯思然,朱顺妮,王忠铭. 微藻污水处理研究进展[J]. 环境工程, 2019, 37(4): 57-62, 56.
FENG Siran, ZHU Shunni, WANG Zhongming. Microalgal wastewater treatment: a review[J]. Environmental Engineering, 2019, 37(4): 57-62, 56.
- [5] 刘广民,王丽娟,苏旭东,等. 微藻吸收利用 CO₂ 的影响因素及吸收能力研究[J]. 哈尔滨工程大学学报, 2013, 34(2): 261-264.
LIU Guanmin, WANG Lijuan, SU Xudong, et al. Study on the influencing factors and absorbing capacity of absorbing CO₂ by microalgae[J]. Journal of Harbin Engineering University, 2013, 34(2): 261-264.
- [6] 梁帅,颜冬云,徐绍辉. 重金属废水的生物治理技术研究进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(11): 108-114.
LIANG Shuai, YAN Dongyun, XU Shaohui. Review on microbiological and botanical treatment technology for Heavy Metal Wastewater[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(11): 108-114.
- [7] 胡光荣,范勇,李福利. 微藻中的高附加值天然产物与挖掘策略[J]. 氨基酸和生物资源, 2015, 37(4): 1-6.
HU Guangrong, FAN Yong, LI Fuli. High valuable natural products in microalgae and discovery strategies[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2015, 37(4): 1-6.
- [8] 陈艳梅,石阳,王明兹,等. 海产养殖饵料微藻开发利用进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 60-65.
CHEN Yanmei, SHI Yang, WANG Mingzi, et al. The proceeding on exploiting and utilization of feed microalgae in mariculture[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 60-65.
- [9] 张学成,薛命雄. 我国螺旋藻产业的现状和发展潜力[J].

- 生物产业技术, 2012(2): 47-53.
- ZHANG Xuecheng, XUE Mingxiong. Current situation and development potential of *Spirulina* industry in China[J]. Biobusiness, 2012(2): 47-53.
- [10] 韦金河. 小球藻大面积养殖技术[J]. 江苏农业科学, 2004(2): 74-76.
- WEI Jinhe. Technology of chlorella culture in large area[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2004(2): 74-76.
- [11] 吕本松. 小球藻养殖技术的研究[J]. 盐业与化工, 2013, 42(9): 16-19.
- LV Bensong. Study on culture technology of Chlorella[J]. Salt and Chemical Industry, 2013, 42(9): 16-19.
- [12] 伍先绍, 贺稚非, 龚霄. 杜氏盐藻及其在功能食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 127-130.
- WU Xianshao, HE Zhifei, GONG Xiao. *Dunaliella salina* and its application in foods[J]. China Food Additives, 2008(2): 127-130.
- [13] 唐淑萍, 马志远, 何娜. 利用 311 藻液分离机提高盐生杜氏藻采收[J]. 盐科学与化工, 2020, 49(4): 20-22.
- TANG Shuping, MA zhiyuan, HE Na. Improving the recovery of *Dunaliella Salina* by 311 liquid separator[J]. Journal of Salt Science and Chemical Industry, 2020, 49(4): 20-22.
- [14] 蔡明刚, 李峰. 雨生红球藻规模化培养技术的研发进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 733-741.
- CAI Minggang, LI Feng. Recent advance in *Haematococcus pluvialis* scale culture technology[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(5): 733-741.
- [15] LI Xin, WANG Xiaoqian, DUAN Chuanlan, et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Biotechnology Advances, 2020, 43: 107602.
- [16] 杨震, 彭选明, 彭伟正. 作物诱变育种研究进展[J]. 激光生物学报, 2016, 25(4): 302-308.
- YANG Zhen, PENG Xuanming, PENG Weizheng. Advances in crop mutagenesis breeding[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2016, 25(4): 302-308.
- [17] HLAVOVA M, TUROCY Z, BISOVA K. Improving microalgae for biotechnology — From genetics to synthetic biology[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1194-1203.
- [18] 单晓慧, 王瑶, 赵东升. 微藻育种的研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(16): 142-143, 147.
- SHAN Xiaohui, WANG Yao, ZHAO Dongsheng. Advances in microalgae breeding[J]. Modern Agricultural Technology, 2020(16): 142-143, 147.
- [19] LEE S K, CHOU H, HAM T S, et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(6): 556-563.
- [20] CHOI J II, YOON M, JOE M, et al. Development of microalga *Scenedesmus dimorphus* mutant with higher lipid content by radiation breeding[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2014, 37(12): 2437-2444.
- [21] LIU Jinghua, CHEN Jun, ZHU Chen, et al. Isolation and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) produced by dielectric barrier discharge plasma[J]. Phycologia, 2016, 55(6): 650-658.
- [22] HENLEY W J, LITAKER R W, NOVovesk L, et al. Initial risk assessment of genetically modified (GM) microalgae for commodity-scale biofuel cultivation[J]. Algal Research, 2013, 2(1): 66-77.
- [23] WIJFFELS R H, KRUSE O, HELLINGWERF K J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(3): 405-413.
- [24] 苗妮. 欧盟通过新规定限制种植转基因作物[N]. 中国科学报, 2014-06-16(3).
- MIAO Ni. The European Union has approved new rules restricting the cultivation of genetically modified crops[N]. Chinese Journal of Science, 2014-06-16(3).
- [25] 王洪伟. 转基因植物标记基因的安全性问题及其对策[J]. 生物学教学, 2014(5): 68-69.
- WANG Hongwei. Safety problems and countermeasures of transgenic plant marker genes[J]. Biology Teaching, 2014(5): 68-69.
- [26] 付峰. 藻类诱变育种技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 64-69.
- FU Feng. Research advance on the algae mutation breeding technologies[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 64-69.
- [27] 钟政, 刘广发. 富含 β -胡萝卜素杜氏藻的紫外线诱变筛选[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(S2): 158-161.
- ZHONG Zheng, LIU Guangfa. UV radiation and screen for β -carotene-rich strain of *Dunaliella*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2008, 47(S2): 158-161.
- [28] 周玉娇, 李亚军, 费小雯, 等. 小球藻紫外线诱变及高含油藻株筛选[J]. 热带作物学报, 2010, 31(12): 2124-2129.
- ZHOU Yujiao, LI Yajun, FEI Xiaowen, et al. UV-irradiation of *Chlorella vulgaris* and screening of petroliferous strains[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(12): 2124-2129.
- [29] ZHANG X, ZHANG X F, LI H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396.

- [30] 赵林姝, 刘录祥. 农作物辐射诱变育种研究进展[J]. 激光生物学报, 2017, 26(6): 481-489.
ZHAO Linshu, LIU Luxiang. Research progresses in irradiation-induced mutation breeding in crops[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(6): 481-489.
- [31] 曹媛媛, 甘旭华, 赵良侠, 等. 紫外线和 60Co γ 射线对钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)的诱变效应[J]. 激光生物学报, 2006, 15(5): 478-482.
CAO Yuanyuan, GAN Xuhua, ZHAO Liangxia, et al. Mutagenic effect of UV and 60Co γ Ray on A9 strain of *Arthrospira platensis*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2006, 15(5): 478-482.
- [32] ERMAVITALINI D, SARI I P, PRASETYO E N, et al. Effect of gamma 60Co irradiation on the lipid content and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. Microalgae[C]// MURKOVIC M, RISULEO G, PRASETYO E N, et al. Proceeding of International Biology Conference 2016: Biodiversity and Biotechnology for Human Welfare. Melville, US: AIP Publishing LLC, 2017.
- [33] 李雪平, 金珂, 张向军. 化学诱变剂诱变植物的研究进展[J]. 现代农业, 2019, 512(2): 38-39.
LI Xueping, JIN Ke, ZHANG Xiangjun. Research progress of mutagenic plants induced by chemical mutagens[J]. Modern Agriculture, 2019, 512(2): 38-39.
- [34] 刘红全, 林小园, 潘艺华. 小球藻的甲基磺酸乙酯诱变及产 EPA 的条件研究[J]. 广西植物, 2016, 36(3): 355-360.
LIU Hongquan, LIN Xiaoyuan, PAN Yihua. EMS mutagenesis of *Chlorella* and the conditions of producing EPA research[J]. Guihaia, 2016, 36(3): 355-360.
- [35] ONG S C, KAO C Y, CHIU S Y, et al. Characterization of the thermal-tolerant mutants of *Chlorella* sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(8): 2880-2883.
- [36] PERIN G, BELLAN A, SEGALLA A, et al. Generation of random mutants to improve light-use efficiency of *Nannochloropsis gaditana* cultures for biofuel production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 161-174.
- [37] 崔清志, 刘晓虹, 陈惠明. EMS 诱变技术研究进展[J]. 湖南农业科学, 2013(5): 7-9, 13.
CUI Qingzhi, LIU Xiaohong, CHEN Huiming. Research progress of EMS mutagenesis technology[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2013(5): 7-9, 13.
- [38] 曹亚萍, 武银玉, 范绍强, 等. EMS 诱变技术在小麦上的应用[J]. 激光生物学报, 2019, 28(5): 394-404.
CAO Yaping, WU Yinyu, FAN Shaoqiang, et al. Application of EMS mutagenesis in wheat[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2019, 28(5): 394-404.
- [39] GREENE E A, CODOMO C A, TAYLOR N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*[J]. Genetics, 2013, 164(2): 731-740.
- [40] COCK J, MARK P, AKIRA F, et al. Genome-wide comparison of ultraviolet and ethyl methanesulphonate mutagenesis methods for the brown alga *Ectocarpus*[J]. Marine Genomics, 2015, 24(1): 109-133.
- [41] KAWAROE M, SUDRAJAT A, HWANGBO J, et al. Chemical mutagenesis of microalgae *Nannochloropsis* sp. Using EMS[J]. Current Journal of Applied Science & Technology, 2015, 8(5): 494-505.
- [42] 余应年. 化学诱变剂诱发基因突变分子机理研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(1): 10-12.
YU Yingnian. Molecular mechanism of gene mutation induced by chemical mutagens[J]. Journal of Health Toxicology, 2000, 14(1): 10-12.
- [43] 余应年, 杨军. 化学诱变剂诱发基因非定标性突变的分子机理研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(5): 4-9.
YU Yingnian, YANG Jun. Molecular mechanism of chemical mutagens - induced gene non - scaling mutation[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Science), 2003, 32(5): 4-9.
- [44] 李勇斌, 左正宏, 李博文, 等. MNNG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)诱变坛紫菜原生质体的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(3): 400-403.
LI Yongbin, ZUO Zhenghong, LI Bowen, et al. Studies on protoplasts morphological change and growth of *Porphyra haitanensis* treated with MNNG[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(3): 400-403.
- [45] 邹立红, 张学成. 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[J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 47-51.
ZOU Lihong, ZHANG Xuecheng. Effects of mutagen MNNG on cell morphological change and growth of marine microalgae *Tetraselmis* sp.[J] Marine Sciences, 2003, 27(8): 47-51.
- [46] 梁英, 闫译允, 赖秋璇, 等. 微藻诱变育种研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(6): 19-32.
LIANG Ying, YAN Yiyun, LAI Qiuxuan, et al. Advances in microalgae mutagenesis breeding[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(6): 19-32.
- [47] SACHDEVA N, PRAKASH G R, SHANKAR M A, et al. Enhanced lipid production in thermo-tolerant mutants of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738[J]. Bioresour Technol, 2016, 221: 576-587.
- [48] ANANDARAJAH K, MAHENDRAPERUMAL G, SOMMERFELD M, et al. Characterization of microalgae *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels[J]. Applied Energy, 2012, 96: 371-377.
- [49] PAREL V K, MAJI D, PANDEY S S, et al. Rapid bud-

- ding EMS mutants of *Synechocystis* PCC 6803 producing carbohydrate or lipid enriched biomass[J]. Algal Research, 2016, 16: 36-45.
- [50] JIN E S, FETH B, MELIS A. A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2003, 81(1): 115-124.
- [51] KIM M, AHN J, JEON H, et al. Development of a *Dunaliella tertiolecta* strain with increased zeaxanthin content using random mutagenesis[J]. Marine Drugs, 2017, 5(6): 189-203.
- [52] 刘长斌, 佟少明, 侯和胜. 利用叶绿素荧光快速筛选紫外诱变高含油小球藻[J]. 激光生物学报, 2017, 26(2): 126-131.
LIU Changbin, TONG Shaoming, HOU Hesheng. The rapidly screening of UV-induced high lipid *Chlorella. Sorokiniana* using chlorophyll fluorescence[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(2): 126-131.
- [53] 王芝瑶. 重离子诱变创制高产油微拟球藻新品种[J]. 生物工程学报, 2013, 29(1): 119-122.
WANG Zhiyao. A new variety of high yield *Oiliococcus micrococcus* was created by heavy ion mutation[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2013, 29(1): 119-122.
- [54] 吴晓英, 柳泽深, 姜悦. 雨生红球藻等离子诱变及高产藻株的筛选[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3781-3787.
WU Xiaoying, LIU Zeshen, JIANG Yue. Mutation breeding of *Haematococcus pluvialis* by atmospheric and room temperature plasma and isolation of high-producing mutants[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(9): 3781-3787.
- [55] TANADUL O, NOOCHANONG W, JIRAKRANWONG P, et al. EMS-induced mutation followed by quizaalofop-screening increased lipid productivity in *Chlorella* sp.[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2018, 41(5): 613-619.
- [56] AFLALO C, BING W, ZARKA A, et al. The effect of the herbicide glufosinate (basta) on astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Ztschrift fur Naturforschung C, 1999, 54c: 49-54.
- [57] CHATURVEDI R, FUJITA Y. Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level[J]. Phycological Research, 2006, 54(3): 208-219.
- [58] CHUMPOLKULWONG N, KAKIZONO T, NAGAI S, et al. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine[J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1997, 83(5): 429-434.
- [59] 曹旭鹏, 艾江宁, 刘亚男, 等. 基于常压室温等离子体技术的金藻诱变筛选方法[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(12): 84-90.
CAO Xupeng, AI Jiangning, LIU Yanan, et al. Mutagenic screening method of *Isochrysis zhanjiangensis* by atmospheric and room temperature plasmas[J]. China Biotechnology, 2014, 34(12): 84-90.
- [60] BOUGARAN G, ROUXEL C, DUBOIS N, et al. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga (T-Iso) by a mutation-selection procedure[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(11): 1-9.
- [61] BEACHAM T A, ROOKS P. Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis[J]. Biotechnology Reports, 2015, 16(C): 87-94.
- [62] DOAN T T Y, OBBARD J P. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting[J]. Algal Research, 2012, 1(1): 17-21.
- [63] 闫春宇, 胡冰涛, 王素英. 常压室温等离子体诱变对螺旋藻中氨基酸成分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 60-65.
YAN Chunyu, HU Bingtao, WANG Suying. The influence of atmospheric and room temperature plasma mutation on nutritional value of *Spirulina*[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(1): 60-65.
- [64] 范道春, 张红兵, 刘垒. 富油脂微藻育种技术研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(1): 115-121.
FAN Daochun, ZHANG Hongbing, LIU Lei. Advances in breeding techniques of lipid-rich microalgae[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(1): 115-121.
- [65] ZAYADAN B K, PURTON S, SADVAKASOVA A K, et al. Isolation, mutagenesis, and optimization of cultivation conditions of microalgal strains for biodiesel production[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2015, 62(3): 124-130.
- [66] LIU S, ZHAO Y, LIU L, et al. Improving Cell Growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella* sp. via UV irradiation[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology Part A Enzyme Engineering & Biotechnology, 2015, 175(7): 3507-18.
- [67] MUTHURAJ M, SELVARAJ B, PALABHANVI B, et al. Enhanced lipid content in *Chlorella* sp. FC2 IITG via high energy irradiation mutagenesis[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2019, 36: 63-70.
- [68] 卫治金, 李晓, 王皓楠, 等. 高产油小球藻的低温等离子体诱变育种[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 117-121, 127.
WEI Zhijin, LI Xiao, WANG Haonan, et al. Screening of high oil-producing *Chlorella vulgaris* by low-temperature plasma mutation[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(7): 117-121, 127.
- [69] 李青, 吴洪, 蔡忠贞, 等. 利用流式细胞仪筛选紫外诱变高含油小球藻[J]. 中国油脂, 2018, 43(5): 110-112,

122.
LI Qing, WU Hong, CAI Zhongzhen, et al. Screening of UV-mutated *Chlorella zofingensis* with high lipid content using flow cytometry[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(5): 110-112, 122.
- [70] 刘秀花, 梁梁, 陈仲达, 等. 小球藻等离子束诱变高产菌筛选[J]. 河南科技, 2016(7): 122-124.
LIU Xiuhua, LIANG Liang, CHEN Zhongda, et al. Screening high oil production strains from plasma-beam treated mutagenic *Chlorella*[J]. Henan science and technology, 2016(7): 122-124.
- [71] 胡小文, 马帅, 付莉莉, 等. 紫外诱变热带微藻选育高油脂藻株[J]. 热带农业科学, 2011, 31(7): 25-28.
HU Xiaowen, MA Shuai, FU Lili, et al. Breeding of lipid-rich microalgae with tropical microalgae by ultraviolet mutation[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2011, 31(7): 25-28.
- [72] VIGEOLAS H, DUBY F, KAYMAK E, et al. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162(1): 3-12.
- [73] 陈建楠, 陈由强, 薛婷. 利用 UV 和 ARTP 诱变筛选优良性状的球等鞭金藻[J]. 福建农业科技, 2020(2): 9-16.
CHEN Jiannan, CHEN Youqiang, XUE Ting. Mutation screening of *Isochrysis galbana* with excellent characters by using UV and ARTP treatments[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2020(2): 9-16.
- [74] LIM D K Y, SCHUHMANN H, SHARMA K, et al. Isolation of high-lipid *Tetraselmis suecica* strains following repeated UV-C mutagenesis, FACS, and high-throughput growth selection[J]. Bioenergy Research, 2015, 8(2): 750-759.
- [75] 何文栋. 微拟球藻富油藻株筛选及柱状光生物反应器培养评价研究[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 1112-1117.
HE Wendong. Screening of lipid-rich *Nannochloropsis oceanica* mutants and evaluation using a bubble column photobioreactor[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(5): 1112-1117.
- [76] 曹晓菲, 丰圣伟, 宋新伟, 等. 小球藻(*Chlorella vulgaris*)抗铵品系的紫外诱变选育[J]. 广西科学, 2016, 23(2): 120-124.
CAO Xiaofei, FENG Shengwei, SONG Xinwei, et al. UV mutagenesis and screening for ammonium tolerant strains of *Chlorella vulgaris*[J]. Guangxi Sciences, 2016, 23(2): 120-124.
- [77] SIVARAMAKRISHNAN R, INCHAROENSADKI A. Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment[J]. Bioresource Technology, 2017, 235: 366-370.
- [78] MA Y, WANG Z, ZHU M, et al. Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis[J]. Bioresource Technology, 2013, 136: 360-367.
- [79] ZHANG Y, HE M, ZOU S, et al. Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane sulfonate-induced mutation[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 268-275.
- [80] CHITLARU E, PICK U. Selection and characterization of *Dunaliella salina* mutants defective in haloadaptation[J]. Plant Physiology, 1989, 91(2): 788-794.
- [81] 陆开形, 蒋霞敏. 叠氮钠(NaN_3)诱变对雨生红球藻的生理效应[J]. 科技通报, 2007, 23(3): 351-355.
LU Kaixing, JIANG Xiamin. Physiological effects of sodium ozide (NaN_3) mutation on *Haematococcus pluvialis*[J]. Bulletin of Science and Technology, 2007, 23(3): 351-355.
- [82] CHENG J, LI K, YANG Z, et al. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress[J]. Bioresource Technol, 2016, 204: 49-54.
- [83] LIU J, CHEN J, CHEN Z, et al. Isolation and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) produced by dielectric barrier discharge plasma[J]. PHYCOLOGIA, 2016, 55(6): 650-658.
- [84] WANG N, GUAN B, KONG Q, et al. Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* mutants by three-stage mutagenesis breeding[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 236: 71-77.
- [85] LEE T M, TSENG Y F, CHENG C L, et al. Characterization of a heat-tolerant *Chlorella* sp. GD mutant with enhanced photosynthetic CO_2 fixation efficiency and its implication as lactic acid fermentation feedstock[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 214-226.
- [86] CORDERO B F O I, COUSO I, LEON R, et al. Enhancement of lutein production in *chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis[J]. Mar Drugs, 2011, 9: 1607-1624.
- [87] 王小万. 盐藻的紫外诱变及优势藻株的初步筛选[J]. 饮料工业, 2010, 13(9): 26-30.
WANG Xiaowan. Ultraviolet radiation mutagenesis and selection of dominance strains of *Dunaliella salina*[J]. Beverage Industry, 2010, 13(9): 26-30.
- [88] 李悦明. 高产二十碳五烯酸的微拟球藻藻株的诱变选育[J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(3): 189-192.
LI Yueming. Improvement of the eicosapentaenoic acid yield in *Nannochloropsis* using a new breeding strategy[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2018, 47(3): 189-192.
- [89] 谢凤行, 周可, 张峰峰, 等. 一株高蛋白含量小球藻 TX 的分离鉴定及其诱变育种[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 821-828.

XIE Fengxing, ZHOU Ke, ZHANG Fengfeng, et al. Isolation, identification and mutation breeding of *Chlorella*

sorokiniana TX with high protein content[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 821-828.

Advances in the research and application of mutagenesis in microalgae

YANG Duan-peng¹, LI Zhong-xian¹, WANG Sheng-nan¹, NIU Jian-feng³,
WANG Guang-ce³, LI Jian^{1, 2}

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, China; 2. Panzhihua Gesala Biotechnology Co. Ltd., Panzhihua 617000, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Nov. 3, 2020

Key words: microalgae; gene mutagenesis; screening of mutants; high value-added products

Abstract: Microalgae are single-cell, photosynthetic organisms and primary producers. They have vital applications in the fields of food, energy, and medicine and the environment. Wild-type strains of microalgae have been used in industry after collection and selection efforts. The genotypes and phenotypes of wild-type strains can be improved through mutagenesis and genetic engineering. Mutants acquired through mutagenesis are not considered genetically modified organisms; however, they may bear superior traits for industrial applications. In this study, we have reviewed advances in mutagenesis of microalgal genes and provided insights for applying this methodology for the industrial exploitation of microalgae.

(本文编辑: 丛培秀)