

甲基磺酸乙酯对螺旋藻的诱变作用

张学成

谭桂英

(青岛海洋大学生物系) (中国科学院海洋研究所, 青岛)

何丽容 党宏月

(青岛海洋大学生物系)

70年代以来,螺旋藻(*Spirulina* sp.)受到高度重视,这是因为螺旋藻的蛋白含量高,氨基酸组成合理,可作为食物及饲料的理想蛋白源,而且在保健食品、医药及控制污染、寻求新的能源方面也具有广泛的应用前景^[1]。

除此之外,螺旋藻与研究过的一些其他蓝藻一样,对紫外线及各类电离射线有很强的抗性^[2-4]。甚至还发现螺旋藻有抗癌作用(尹春南等,未发表资料)。一般认为,这是由于蓝藻内存在一套完整的DNA修复系统^[4-5]。

然而,与其他生物一样,螺旋藻也存在着自发及诱发的变异。Lewin(1980)在钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中发现了螺旋松弛的品系,并且这种变异是遗传的。因而提出根据螺旋情况进行分类是不合理的^[6]。Pelosi(1971)用紫外线处理钝顶螺旋藻,结果得到两株突变体,其形态及对抗生素的反应均有变化^[7]。胡天赐用⁶⁰Co- γ 射线照射螺旋藻,照射后不同剂量及同一剂量的不同细胞株之间形态上有较大差异,经照射后长成的细胞株显现出一定的抗逆性(胡天赐,未发表资料)。当然,还有大量的没有报道的自发突变。实际上,这种自发突变是选择优良品系的主要来源。

本实验用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(Ethyl Methanesulphonate,简称为EMS)对钝顶螺旋藻进行诱变处理,然后在群体及个体水平上进行形态学观察及生长速度的测定。结果表明,螺旋藻在诱变处理后不但在形态(藻体长度、螺距、螺旋数等)及生长速度产生了遗传的变异,而且耐低温性能也有所改进。这种诱变作用可以作为螺旋藻优良品系选育的一种手段。

一、材料与方 法

本实验所用钝顶螺旋藻种由中国科学院海洋研究所提供。藻种的特点是藻体个体较短,生长速度较快,是一种在淡水生长的藻类,但经过海水驯化后,也可在海水中良好生长。实验中所用培养液为Zarrouk培养液^[8]。培养温度为24—26℃。光源为日光灯,光强约

3 000 lx, 光暗周期为12/12 (h)。

诱变方法, 将生长良好的螺旋藻藻液倒入离心管离心 (500rpm, 5 min), 然后用吸管轻轻吸取上层藻体, 用 0.1mol/dm^3 的EMS进行诱变处理, 处理时间分别为20, 40, 60及80min。用未经处理的作为对照。诱变处理后将藻体用培养液冲洗三次, 置三角瓶中进行培养。

用72型分光光度计测定光密度来确定和比较诱变各组的生长情况, 所用波长为560nm。诱变处理一周后, 调整各组的浓度, 使其光密度一致。然后每隔4天测一次光密度, 共测4次。

计算生长率公式用 $k = \frac{1}{t} \ln \frac{W_1}{W_0}$ 。式中 W_0 为开始培养的生物量, W_1 为培养结束时的生物量, t 表示培养的天数^[9]。

本实验除在群体水平上研究钝顶螺旋藻对EMS的反应外, 还在诱变后进行了单个藻体的分离培养。单个藻体是从诱变处理60min的群体中分离出来的, 共分出128株单个藻体, 将分离出的单个藻体分别置于试管中培养。大约培养两个月的时间, 就发现有的试管的藻液变为淡绿色, 这说明这些试管的单个藻体已经成活, 并且开始繁殖。然后测量各株的藻体长度、螺距、螺径及螺旋数目等参数。每株测定30个藻体, 以便进行统计分析。将试管的藻液转入三角瓶中培养。大约培养一个月后, 进行光密度的测定, 以比较各藻株之间生长速度的差异。

钝顶螺旋藻是一种喜高温的藻种, 它的适宜温度范围为 $25-35^\circ\text{C}$ ^[10]。而在我国北方, 高温季节短, 从而缩短了螺旋藻的生长时间, 影响了螺旋藻的产量。因此, 在北方大规模培养螺旋藻, 筛选耐低温品系是很重要的。本实验进行了耐低温品系的筛选。筛选的方法是, 对螺旋藻进行化学诱变后, 置于低温下 ($8-12^\circ\text{C}$) 培养两个月, 然后选择色素正常、生长良好的藻体进行分离培养。共分出50株单个藻体, 然后再放在低温下培养两个月, 有23株成活。在 15°C 条件下测定各株的生长速度, 两天测一次光密度, 共测6次。还测定了它们的形态参数。

二、结果与讨论

本实验得到的结果表明, 钝顶螺旋藻用化学诱变剂EMS处理后, 发生了真实的可遗传的变异。一是在群体水平上生长速度受到抑制; 二是在单个藻体培养的条件下, 不同藻株的形态及生长速度有明显变化; 三是选出了耐低温性能较好的藻株。

1. 在本实验所用的EMS的浓度条件下, 螺旋藻经过处理后, 在群体水平上生长速度明显地受到抑制。这种抑制作用随着诱变时间的延长而增强 (图1)。回归分析结果表明, 回归方程为 $y = 0.1219 - 0.00126x$, 生长率 k 与诱变时间呈负相关, 相关系数为 $r = -0.9838$, $p < 0.01$ 。这完全符合诱变剂的作用与剂量 (在这里是诱变时间) 的关系-剂量效应。

值得提及的是, 光密度的测定是在诱变处理后的第8天开始的, 而且在前两次的测定中, 对照组及各处理组的数据差别不大, 也就是说, 在诱变处理半个月后, 对照组及处理各组生长速度无明显差异。但是在以后的几次测定中, 对照组与各处理组的生长速度明显

的不同。而且在诱变处理50天后, 再重复测定, 亦得到了完全相同的结果。看来, 钝顶螺旋藻在诱变处理后生长速度的改变不是由于诱变剂EMS的毒性造成的生理上的暂时的差异, 而是由于遗传物质的变化所造成的遗传的变异。

诱变处理后藻体形态的变化也可以印证上述观点。对照组藻体比较均匀一致(图版 I-1), 而处理组藻体则不整齐, 表现为藻体段比较多, 藻体大小不一, 有的藻体螺旋特别紧密, 有的藻体长度明显大于对照组(图版 I-2-4)。

2. 诱变处理后, 进行单藻培养, 各藻株之间藻体形态及生长速度不同。

在群体水平上进行诱变处理和培养时, 在某些情况下, 诱变效应可能被掩盖起来。所以在单个藻体的水平上研究诱变效应是十分必要的。我们从诱变处理60min的群体中分离出128个单个藻体, 待培养2个月左右, 然后测量各株藻体的长度、螺距、螺径及螺旋数。我们测量了52个藻株, 从中看出螺旋藻受EMS诱变处理后上述几个参数明显发生变异。其中有5株差异更为明显(表1)。诱变处理后藻体长度一般比对照组大, 但也有少数藻株体长度比对照组小(进行*t*检验的结果表明, 差异都是显著的)。如S-51藻体长度平均为1167.7 μ m, 约为对照组(222.9 μ m)的5倍; S-46藻体长度平均为153.8 μ m, 仅为对照组的69%。诱变处理后螺距的变化也很明显。大多数藻株的藻体螺距小于对照组。螺距最大的藻株是S-32, 为88.1 μ m, 是对照组的110%; 螺距最小的是S-52, 仅有30.1 μ m, 为对照组的37.5%。藻体螺旋数在诱变处理后变化也比较大。大多数藻株的螺旋数比对照组增加。如S-51的螺旋数达17.6个, 是对照组的6倍。藻体的螺径在各藻株中差异不大, 与对照组的差别也不大。螺径最大的藻株是S-52, 为46.8 μ m, 是对照组的140%, 螺径最小的是S-38, 只有30.2 μ m, 是对照组的90%。看来在螺旋藻的几个形态参数中, 螺径是比较保守的。

表1 钝顶螺旋藻受EMS诱变处理后藻体形态参数的变化

编号	藻体长度 (μ m)	螺距 (μ m)	螺径 (μ m)	螺旋数 (个)
对照	222.9 \pm 26.75	80.2 \pm 8.75	33.4 \pm 4.05	2.9 \pm 0.43
S-32	280.5 \pm 52.65	88.1 \pm 10.95	44.3 \pm 6.15	3.3 \pm 0.64
S-38	358.6 \pm 50.76	63.9 \pm 4.90	30.2 \pm 1.97	5.6 \pm 0.77
S-46	153.8 \pm 17.74	63.2 \pm 6.00	37.9 \pm 2.75	2.4 \pm 0.20
S-51	1167.3 \pm 84.57	69.4 \pm 2.94	36.9 \pm 1.80	17.6 \pm 1.27
S-52	217.3 \pm 46.21	30.1 \pm 3.77	46.8 \pm 5.03	7.2 \pm 1.38

图版 I-5-8 显示了几个藻株的形态特征。从图中看出, 在每个藻株内藻体的大小和形态是比较一致的, 而各藻株之间却有明显的差异。图版 I-8 是藻株 S-51, 其藻体长度是对照组的5倍。

钝顶螺旋藻经EMS诱变处理后生长速度也发生明显变化(图2)。图中, S-18藻株的生长速度比未经处理的对照藻株快, 而S-51藻株比对照组生长速度要慢。诱变处理是1988年5月下旬进行的, 而这些藻株的生长速度的测定是9月下旬开始的, 即诱变处理4个月后的。这种差异再一次说明钝顶螺旋藻受EMS诱变处理后产生的变异是真实的、遗传的变异。

3. 选出了耐低温性能较好的藻株
对选出的两株耐低温性能较好的藻株 cc-28 与 cc-30, 在 15°C 条件下进行了生长速度的测定, 并与对照藻株 F₁₆ 进行了比较. 比较结果表明, 这两株藻株比对照组生长速度要快 (图 3). 藻液色素正常, 呈蓝绿色; 而对照藻株藻液呈黄绿色. 说明螺旋藻经诱变处理后, 改变了它的适温范围, 这对在我国北方大规模培养螺旋藻是很有意义的.

对选出的低温藻株还进行了各形态参数的测定 (表 2). 从表中可以看出, 这两个耐低温藻株的藻体长度比对照藻株要小, 这种差异是高度显著的.

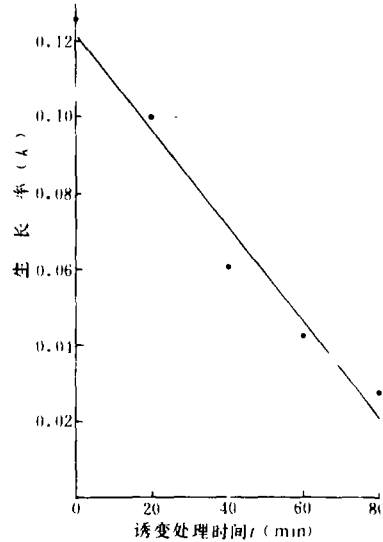


图 1 钝顶螺旋藻受 EMS 诱变处理后生长率 k 与诱变处理时间的关系

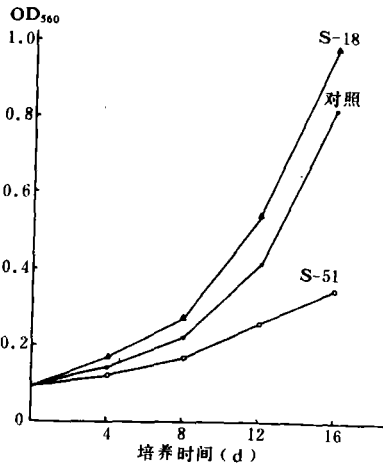


图 2 钝顶螺旋藻受 EMS 诱变处理后生长速度的变化

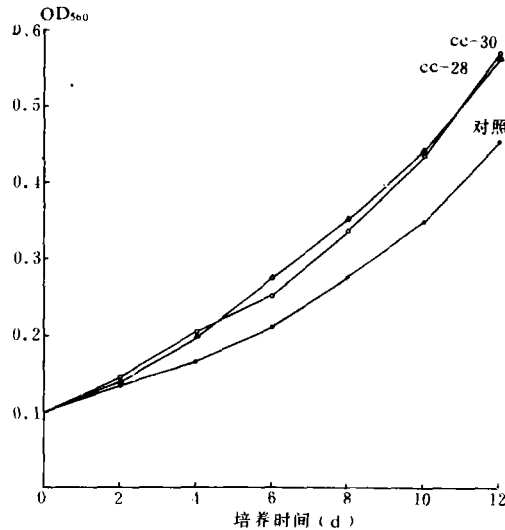


图 3 耐低温藻株与对照藻株生长速度的比较

表 2 钝顶螺旋藻耐低温藻株与对照藻株形态参数的比较

编号	藻体长度 (μm)	螺距 (μm)	螺径 (μm)	螺旋数 (个)
对照	222.9 ± 26.75	80.2 ± 8.75	33.4 ± 4.05	2.9 ± 0.43
cc-28	172.99 ± 26.61	65.93 ± 6.15	37.31 ± 5.62	2.67 ± 0.33
cc-30	171.51 ± 30.63	69.11 ± 5.83	32.33 ± 2.86	2.38 ± 0.38

螺旋藻对紫外线和电离射线有很强的抗性^[4]. 在 DNA 受到损伤后, 不仅能进行光修复, 而且能进行暗修复^[5]. 进而有人证明螺旋藻抗癌作用, 在应用上显示了诱人的前景. 但

是, 生物的变异是普遍存在的. 在蓝藻中, 诱发突变的研究有过大量的报道, 如抗性突变、形态及发育突变、色素突变、温度敏感型突变, 以及营养缺陷型突变^[11]. 在螺旋藻中, 也有形态突变及抗性突变的报道^[6, 7] 以及光合作用膜蛋白质的变化和脂肪酸含量的变化^[12]. 本实验的结果也表明, 用适宜的诱变剂, 在一定条件下, 螺旋藻不仅可以诱发突变, 而且突变频率还是比较高的. 螺旋藻是原核细胞, 一旦遗传物质发生变异, 就可得到表现. 诱发突变, 加以适当的选择, 这在选育螺旋藻优良品种方面是可以大有作为的. 例如, 为在我国北方大规模地培养螺旋藻, 在春季需耐低温品种; 在那些昼夜温差较大的地区需选用温度适应范围比较广的品种^[11]. 本实验中筛选出了两株耐低温藻株, 这对在高纬度区培养螺旋藻是有现实意义的.

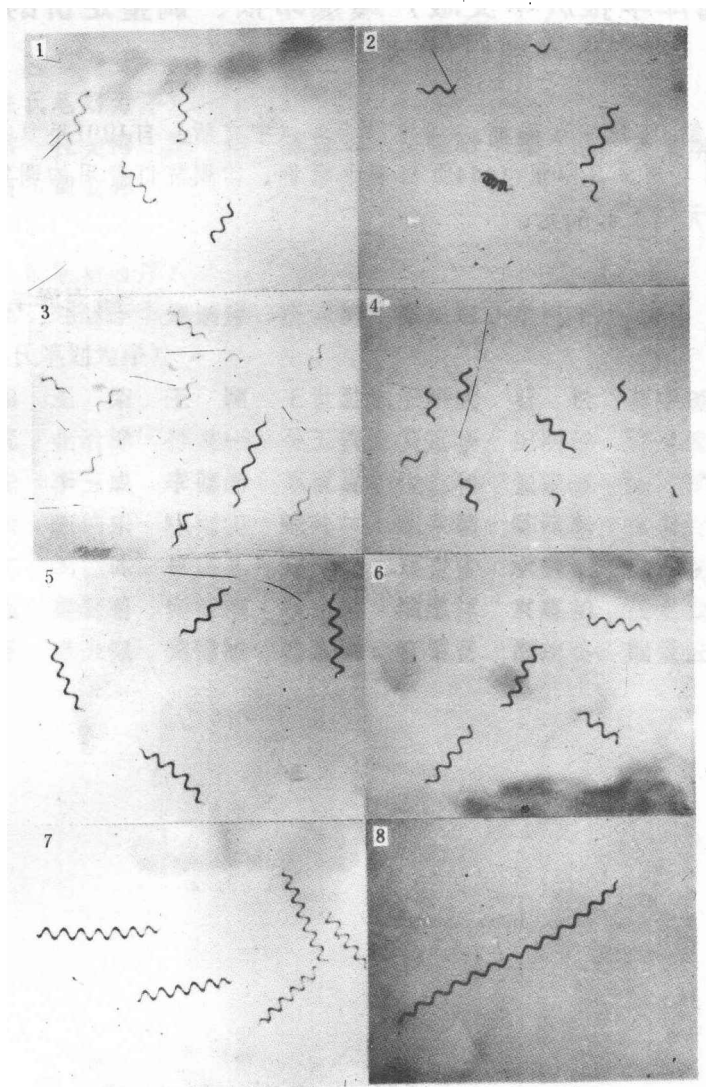
本实验所用的化学诱变剂EMS是一种烷化剂, 诱发突变的机理是引起碱基置换和移码突变^[13]. 在海藻遗传研究中, EMS曾成功的用来在多细胞海藻江蕨中诱发突变^[14]. 在蓝藻中, 也曾用来诱发组囊藻属的*Anacystis nidulans*的突变型^[15, 16]. 而且, 用甲基磺酸乙酯进行诱变, 操作简便. 在海藻遗传研究中, 是一种经济、方便、高效的诱变剂.

目前, 螺旋藻是依据形态特征进行分类的, 如藻丝的粗细、螺距的大小与藻丝的端部形态等^[17]. 我们已列举了一些事实, 说明螺旋藻的形态是不断发生变异的. 在人工诱变的条件下, 变异发生的频率会大大提高. 本实验的结果又一次证明了这个道理. 因此, 我们赞同Lewin的意见, 仅仅依据形态进行螺旋藻的分类是不充分的^[6].

参 考 文 献

- [1] L. V. Venkataraman 著, 周百成译, 印度螺旋藻研究和开发, 海洋科学通报, 1988, 2: 49—60.
- [2] 刘嘉炼, 应用微生物, 华香出版社, 1980, 74—75.
- [3] Garr, N. G. et al., *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell Scientific Publications, London, 1982, 263—305.
- [4] 阮继红等, 螺旋藻抗辐射的研究, 遗传, 10 (1988), 2: 27—30.
- [5] Lewin, R. A., *The Genetics of Algae*, Blackwell Scientific Publications, London, 1976, 13—14.
- [6] Lewin, R. A., Uncoiled variants of *Spirulina platensis*, *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 60 (1980), 1: 48—52.
- [7] Pelosi, E. et al, Mutation of *Spirulina platensis* induced by UV rays and by antibiotics, *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 1971, 21: 25—36.
- [8] Zarrouk, C., Contribution a l'Etude d'une Cyanophycee Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques Sur la Croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*, Thesis, University of Paris, 1966.
- [9] Zhang, X. C. and van der Meer, J. P., A study on heterosis in diploid gametophytes of red alga *Gracilaria tikvahiae*, *Botanica Marina*, 1987, 30: 309—314.
- [10] Soong, P., Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, *Algae Biomass*, Elsevier /North-Holland Biomedical Press, 1980, 89—113.
- [11] Lewin, R. A., The genetics of algae, Blackwell Scientific Publications, London, 1976, 9—13.
- [12] Vonshak, A., Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production, *Hydrobiologia*, 1987, 151—152.
- [13] Auerba, C., *Mutation Research*, Chapman and Hall Ltd., London, 1976, 281—282.

-
- [14] van der Meer, J. P., Genetics of *Gracilaria* sp. V. Isolation and Characterization of mutant Strains, *Phycologia*, **18** (1979), 1:47—54.
- [15] Delaney, S. F. and Carr, N. G., Temporal genetic mapping in the blue-green alga *Anacystis nidulans* using ethyl methanesulphonate, *J. Gen. Microbiol.*, 1975, 88:259—268.
- [16] Kumar, H. D., Action of mutagenic chemicals on *Anacystis nidulans*, II. Ethyl methanesulphonate, *Beitr. Biol. Pflanzen*, 1968, 45:161—170.
- [17] Geitler, L., *Cyanophyceae*, *Koeltz Scientific Books*, Koenigstein, 1985, 916—931.



钝顶螺旋藻受EMS 诱变处理后形态的变化 (×45)

1——对照藻株 2—4——诱变处理后形态的变化。注意藻体长度、螺距等形态参数在诱变处理的群体中的不均一性
5——S - 03藻株 6——S - 20藻株 7——S - 48藻株 8——S - 51藻株