

# 海洋微藻后棘藻脂肪酸遗传率的研究<sup>\*</sup>

徐年军<sup>1</sup> 张学成<sup>2</sup> 范晓<sup>1</sup> 韩丽君<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

**摘要** 以海洋微藻后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.) 为材料, 利用数量遗传学手段研究了 9 个品系的脂肪酸的遗传率。研究表明后棘藻脂肪酸含量变化较大, 遗传率较低。棕榈酸 (16:0) 遗传率最高, 为 0.49。肉豆蔻酸 (14:0) 的遗传率最低, 为 0.15。EPA (20:5 $\omega$ 3) 遗传率较低, 为 0.19。这表明环境因子可以较大地影响后棘藻 EPA 的含量, 利用生态调控可以有效地提高藻体 EPA 的含量。

**关键词** 后棘藻, 脂肪酸, 遗传率, EPA

利用海洋微藻生产多不饱和脂肪酸 (PUFA) 是微藻生理活性研究的一个热点<sup>[1]</sup>。提高微藻脂肪酸含量的方法主要是诱变筛选和环境调控。运用遗传率的概念可以判断性状的影响因素主要是由遗传还是由环境决定。如果某性状遗传率高, 可以很好地运用遗传学手段来提高优良性状; 反之, 如果遗传率低, 可以很好地运用生态调控的方法提高优良性状<sup>[2]</sup>。有关微藻脂肪酸遗传率的研究, 只有国外有少量报道。海洋微藻后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.) 是一种很有开发潜力的海藻, 其生长速度快、总脂和 EPA 含量较高。本文运用数量遗传手段对后棘藻的遗传率进行了研究, 结果表明后棘藻脂肪酸遗传率低, 这就为用环境调控提高后棘藻 EPA 含量提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

真刺藻门的后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.) 70-01、278-01 为 Scripps 海洋研究所 Lewin 教授赠送。藻体椭圆球形, 直径约 2.5~3.5  $\mu$ m。藻体为黄绿色, 在 460 nm 下有最大吸收峰。通过诱变挑选后长期保种得到稳定遗传的 7 个品系: 7-A, 7-2, 7-3, 7-6, 7-10, 7-13, 7-14。

### 1.2 培养液、培养条件和方式

用于微藻培养的海水和器皿均经水煮灭菌或高压灭菌后使用, 采用 Provasoli 培养基。恒温室培养, 室温为 22 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C, 以普通日光灯管为光源, 光亮暗周期为 12 h:12 h, 在培养物处的光强为 2 000 lx。分批培养, 在波长 460 nm 下测定 OD 值。所有的培养品系在

对数后期用离心法收集, 低温保存, 实验前冷冻干燥, 备用。

### 1.3 测试方法

生物量用比色法测定, 测定 OD<sub>460</sub>, 然后换算成藻细胞浓度, 换算公式为:

$$Y = 82.449 \times OD_{460} + 34.557$$

Y 表示细胞浓度, 单位为 mg/L。

脂肪酸测定: 称取 10 mg 藻粉样品, 置螺口试管中, 加 50  $\mu$ l 的 19:0 内标和 1 ml 的 KOHCH<sub>3</sub>OH 溶液, 充氮气保护, 混匀, 于 75  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冷却后加 2 ml 1 mol/L 的 HCl-CH<sub>3</sub>OH 溶液 (使 pH<2), 混匀, 75  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冷却, 加 0.2 ml 石油醚和 2 ml 蒸馏水, 充分振荡, 离心 10 min, 取石油醚层, 气相色谱分析。

仪器: 美国惠普公司产 HP 5890 A 型气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器。色谱柱: 毛细管柱, 25 m $\times$  $\Phi$ 0.32 mm, 进样口温度: 250  $^{\circ}$ C。载气: 高纯氮, 流速 2 ml/min, 进样量: 1  $\mu$ l。实验采用程序升温, 150  $^{\circ}$ C 1 min; 150~200  $^{\circ}$ C, 15  $^{\circ}$ C/min; 200~250  $^{\circ}$ C, 2  $^{\circ}$ C/min; 250  $^{\circ}$ C, 10 min。

脂肪酸定性和定量: 与标准品 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 18:3, 19:0, 20:1n9, 20:4n6, 20:5n3, 22:6n3 的出峰时间比

<sup>\*</sup> 国家“九五”科技攻关资助项目 96CO2-04-05、96CO2-01-10-8 号。

第一作者: 徐年军, 出生于 1973 年, 博士。研究方向: 海洋药理学。E-mail: nj@souhu.com

收稿日期: 2000-10-08; 修改日期: 2000-10-30

较,对脂肪酸进行定性分析,以面积法得到各组分的相对百分含量,并根据每种脂肪酸相对于 19:0 内标的峰面积来计算该脂肪酸的绝对含量。公式如下:

$$C = KC_i \frac{P_i}{P_i}$$

$C$ : 待测脂肪酸浓度;  $C_i$ : 内标浓度;

$P_i$ : 待测脂肪酸峰面积;  $P_i$ : 内标峰面积;

$K$ : 常数,与稀释倍数及相应脂肪酸的分子量有关。

#### 1.4 数量性状的遗传方差公式

表 1 后棘藻各品系平均脂肪酸含量(mg/g,  $n=6$ )

Tab.1 Average fatty acid content (mg/g of dry matter) in strains of *Ellipsoidion* sp. ( $n=6$ )

| 品系     | 14:0      | 16:0       | 16:1       | 18:1n9    | 20:4n6    | 20:5n3     |
|--------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| 7-A    | 7.67±0.28 | 45.21±1.81 | 34.64±1.81 | 7.32±0.27 | 5.90±0.27 | 15.67±1.16 |
| 7-2    | 6.92±0.38 | 40.69±1.26 | 33.11±1.82 | 6.77±0.16 | 2.90±0.22 | 15.74±0.98 |
| 7-3    | 7.89±0.54 | 52.55±2.95 | 41.97±2.47 | 8.31±0.32 | 3.42±0.16 | 18.11±0.36 |
| 7-6    | 7.25±0.17 | 46.19±1.38 | 35.61±0.71 | 8.04±0.62 | 2.75±0.18 | 15.50±1.02 |
| 7-10   | 7.77±0.37 | 40.48±1.77 | 35.90±1.62 | 6.21±0.33 | 2.81±0.03 | 18.11±0.36 |
| 7-13   | 7.00±0.39 | 43.39±1.10 | 34.86±1.12 | 6.50±0.06 | 3.17±0.15 | 17.05±1.25 |
| 7-14   | 8.12±0.32 | 45.38±2.01 | 35.13±1.22 | 7.84±0.40 | 3.41±0.06 | 17.59±0.55 |
| 70-01  | 6.08±0.38 | 54.00±0.65 | 42.39±1.55 | 9.28±0.19 | 3.31±0.01 | 13.49±0.27 |
| 278-01 | 7.69±0.13 | 33.61±0.67 | 29.02±0.35 | 7.43±0.31 | 3.64±0.19 | 18.61±0.96 |

量两次,主要脂肪酸含量如表 1。

结果显示:后棘藻主要脂肪酸为 16:0、16:1, EPA(20:5n3)含量也较高。不同品系的脂肪酸含量变异较大,如肉豆蔻酸(14:0)含量为 5.70~9.00;棕榈酸(16:0)含量为 33.80~57.01 mg/g;棕榈油酸(16:1)含量为 28.33~45.95 mg/g; EPA 含量从 13.21 mg/g 到 20.53 mg/g。而且对同一品系的脂肪酸分析中,其平均数的变异范围也较大,最大为 2.95。这表明相同基因型的微藻,其脂肪酸含量有较大的变异。

#### 2.2 后棘藻脂肪酸的遗传率

计算各品系的方差  $\sigma_{\text{strain}}^2$ ,  $\sigma_{\text{flask}}^2$ ,  $\sigma_{\text{analysis}}^2$  和遗传率  $h^2$ , 结果如表 2。

表 2 是后棘藻 6 种主要脂肪酸的遗传方差( $\sigma^2$ )和遗传率( $h^2$ )。实验结果显示:后棘藻脂肪酸组成非常恒定,但主要脂肪酸含量变化较大,因而主要脂肪酸遗传率变化较大。品系间方差  $\sigma_{\text{strain}}^2$  最大,表明由同一藻种挑选的不同品系,其脂肪酸含量变异较大,通过诱变和筛选的方法可以很好地提高后棘藻脂肪酸的含量。 $\sigma_{\text{flask}}^2$  较大说明环境因素对后棘藻有较大的影响,根据遗传率公式得到后棘藻的遗传率都较低,如肉豆蔻酸(14:0)遗传率最小,为 0.15,棕榈酸(16:0)遗传率最大,为 0.49, EPA

$$\sigma_{\text{G}}^2 = [\sigma_{\text{strain}}^2 - (\sigma_{\text{analysis}}^2 + 2\sigma_{\text{flask}}^2)]/4,$$

$\sigma_{\text{strain}}^2$  = 不同品系间平均方差

$\sigma_{\text{analysis}}^2$  = 同一瓶内不同分析间的方差

$\sigma_{\text{flask}}^2$  = 同一品系不同瓶间的方差

广义遗传率  $h^2 = \sigma_{\text{G}}^2 / (\sigma_{\text{G}}^2 + \sigma_{\text{flask}}^2 + \sigma_{\text{analysis}}^2)$

## 2 结果

### 2.1 后棘藻各品系脂肪酸分析

将后棘藻 70-01、278-01 及由 70-01 挑选的 7 个品系做脂肪酸分析,每个品系 3 个平行样,每个样品测

表 2 后棘藻各品系主要脂肪酸的遗传方差和遗传率

Tab.2 Genetic variance and heritability of main fatty acid of *Ellipsoidion* sp.

| FA   | $\sigma_{\text{s}}^2$ | $\sigma_{\text{f}}^2$ | $\sigma_{\text{a}}^2$ | $\sigma_{\text{G}}^2$ | $h^2$ |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| 14:0 | 0.63                  | 0.14                  | 0.14                  | 0.05                  | 0.15  |
| 16:0 | 44.38                 | 2.53                  | 6.20                  | 8.28                  | 0.49  |
| 16:1 | 19.72                 | 3.11                  | 3.96                  | 2.38                  | 0.25  |
| 18:1 | 1.17                  | 0.17                  | 0.11                  | 0.18                  | 0.39  |
| 20:4 | 0.14                  | 0.03                  | 0.02                  | 0.02                  | 0.29  |
| 20:5 | 3.84                  | 0.99                  | 0.48                  | 0.34                  | 0.19  |

注:  $\sigma_{\text{s}}^2$  = 不同品系间平均方差;  $\sigma_{\text{a}}^2$  = 同一瓶内不同分析间的方差;  $\sigma_{\text{f}}^2$  = 同一品系不同瓶间的方差。

(20:5)的遗传率也较低,为 0.19。这一结果表明环境因子能有效地改变后棘藻 (*Ellipsoidion* sp.) 的各种脂肪酸含量。

## 3 讨论

遗传率的研究一般都以二倍体生物为材料,而单倍体生物也是很好的遗传材料。因为其基因型的改变能在子一代的表现型上体现出来,而二倍体生物有显性隐性

之分,基因型的改变只能在子二代表现出来。本实验试图以单倍体微藻为材料,对其遗传率进行研究,从而有效地估计环境因子对微藻体内主要脂肪酸含量的影响的大小。

对微藻脂肪酸的研究表明其可能是数量性状的遗传,但对其遗传率研究的报道很少。Sokal 1981年提出的有关微藻数量性状的遗传方差公式及遗传率公式能很好地表现出微藻脂肪酸的遗传率概念。因此作者应用此公式进行了有关研究,结果与其他实验结果相符。Lopez 1994年报道等边金藻 (*Isochrysis galbana*) 的不同品系的主要脂肪酸遗传率为 0.68~0.99,其中 EPA 的遗传率为 0.99;而不同藻株的主要脂肪酸的遗传率为 0.31~0.43, EPA 的遗传率为 0.43;三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 不同藻株的主要脂肪酸的遗传率为 0~0.96,其中 EPA 的遗传率为 0.41<sup>①</sup>。本实验表明,后棘藻脂肪酸的遗传率较低,为 0.15~0.49,其中 EPA 的遗传率为 0.19。这说明环境因子对后棘藻脂肪酸的影响较大。为了证明这一点,作者进行了环境因子和培养基的优化,在优化后的实验条件下,脂肪酸含量有了很大的变化,EPA 含量有了很大

的提高,这一结果也反过来证明了后棘藻脂肪酸的遗传率较低。Molina 1995年通过测量等边金藻 (*I. galbana*) F<sub>1</sub> 代和 F<sub>2</sub> 代的脂肪酸含量,运用 Kruskal-Wallis 实验法对其脂肪酸遗传率的研究表明:除 18:1 $\omega$ 7 的遗传率为 0.21 外,其他脂肪酸的遗传率均大于 0.91, EPA 和 DHA 的遗传率均为 0.92。

微藻的数量性状遗传中,遗传方差的主要来源是藻种的变异,对后棘藻的脂肪酸分析表明:相同的条件下,后棘藻不同品系的脂肪酸的含量变化较大。由此可见,提高海洋微藻脂肪酸的途径有两种:诱变筛选和生态调控。通过诱变筛选可以有效地提高脂肪酸的含量,但由于遗传率较低,优良性状有可能得不到表达,因此,进行适当的生态调控是提高海洋微藻特定脂肪酸(EPA)的必要手段。

#### 参考文献

- 1 姜悦、陈峰。利用海洋微藻培养生产  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸,海洋科学,1997,18~20
- 2 Caten C. E. *et al.*. Quantitative Genetics. In: McDonald, K. D.. Genetics of Industrial Microorganisms. New York: Academic Press, 1976. 93~111

## STUDIES ON HERITABILITY OF FATTY ACIDS IN MARINE MICROALGA *Ellipsoidion* SP.

XU Nian-jun<sup>1</sup> ZHANG Xue-cheng<sup>2</sup> FAN Xiao<sup>1</sup> HAN Li-jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Oceanology, Chinese Academic of Sciences, Qingdao, 266071)

(<sup>2</sup>College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, 266003)

Received: Oct., 8, 2000

Key Words: *Ellipsoidion* sp., Fatty acids, Heritability, EPA

### Abstract

Fatty acid variation among 9 strains of marine microalga *Ellipsoidion* sp. was analyzed by quantitative genetic methods. The composition of the major fatty acid varied significantly and the heritabilities of them were relatively low. The highest heritability was 0.49 for palmitoleic acid and the lowest was 0.15 for myristic acid. The heritability for EPA (Eicosapentaenoic acid) was 0.19. Lower heritability indicates that EPA composition of *Ellipsoidion* sp. was affected by environmental factors, thus ecological regulation of EPA composition is effective.

(本文编辑:张培新)

① Lopez Alonso Diego *et al.*. *J. Phycol.*, 1994. 30: 553~558