

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16312

不同品系球等鞭金藻在生长及脂肪酸组成上的种内差异

丛超^{1,2}, 胡冬雪^{1,2}, 孙春晓², 乔洪金², 王际英², 张利民²

1. 上海海洋大学 水产与生命科学学院, 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006

摘要: 球等鞭金藻作为一种优良的单细胞生物饵料具有选育价值。目前我国水产养殖上使用的大多数球等鞭金藻品系都来源于同一株藻株 *Isochrysis galbana* OA-3011, 经过多年的地理隔离形成了不同的品系, 为了揭示地理隔离对球等鞭金藻表型性状的影响, 从而为球等鞭金藻的选育工作提供依据, 我们对 5 个品系的球等鞭金藻(*I. galbana* FACHB-861, OA3011-QD, OA3011-LK, OA3011-AY 和 OA3011-LZ)的种属关系、生长和脂肪酸组成进行了比较分析。实验在相同条件下对 5 个品系球等鞭金藻培养 6 d, 提取基因组 DNA 并 PCR 扩增测定 18S rDNA 基因序列, 每天定时记录各品系的 OD₆₆₀, 绘制生长曲线, 在进入稳定期后收获并进行生物量的测定及脂肪酸的气相色谱分析。18S rDNA 基因序列的进化分析表明, OA3011-LK、OA3011-AY 和 OA3011-LZ 具有一致的序列, 而 OA3011-QD 因 1 个碱基的差异与其他 OA3011 出现了分离, FACHB-861 与 OA3011 品系亲缘关系较远; 对生长和脂肪酸进行对比分析后, 结果显示, 5 个品系的球等鞭金藻在不同的时间达到稳定期, 其中 FACHB-861 表现出了与其他品系明显不同的生长模式。FACHB-861 和 OA-3011 品系的生物量具有显著差异, OA3011-LK、OA3011-AY 和 OA3011-LZ 之间也有显著差异($P<0.05$), 但特异增长率各品系间无显著差异($P<0.05$)。FACHB-861 和 OA3011-LZ 的总脂肪酸(TFA)含量显著低于 OA3011-LK、OA3011-QD 和 OA3011-AY($P<0.05$)。FACHB-861 的脂肪酸各成分与 OA-3011 各品系明显不同。然而, 在 OA-3011 各品系间脂肪酸组成也有明显差异, 这表明球等鞭金藻存在广泛和频繁的数量性状表型差异。总之, 地理隔离造成的这些差异为球等鞭金藻的选育提供了可行性。根据生长速度或 DHA、EPA、多不饱和脂肪酸含量等筛选标准初步分析显示, 可对 OA3011-LK、OA3011-QD 进行进一步的选育。

关键词: 球等鞭金藻; 品系; 生长; 脂肪酸; 遗传差异

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0774-09

作为食物链的主要生产者, 微藻具有产生二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)^[1-2]的特殊途径, 因此微藻是许多水生动物幼苗生长必不可少的^[3]。球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)作为一种能够快速生长的微藻已被广泛用作鱼、虾、蟹及贝类幼虫的饵料^[4]。它具有显著的营养价值, 不仅 DHA 含量高^[5-7], 还含有少量的 EPA^[8-11], 研究表明投喂球等鞭金藻可以显著提高虾幼体^[12], 海水鱼幼体^[13]和软体动物幼年阶段^[14]的生长和

存活率。近年来, 一些新的球等鞭金藻品种也被分离出来, 在新型水产饵料和生物柴油的开发等方面均具有潜力^[15]。

目前, 多种球等鞭金藻品系被广泛用于中国的水产养殖和育苗, 其中多数球等鞭金藻品系是来源于同一藻株 *I. galbana* OA-3011, 由陈淑芬^[16]于 1982 年分离出来。此后, 这一藻株被广泛使用, 并通过不同的研究人员和养殖户在全国各地保种, 产生了多种品系, 这些品系的性状特点经过这么

收稿日期: 2016-10-20; 修订日期: 2016-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201973); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013HZ018); 国家海洋生物产业-水生动物营养与饲料研发创新示范平台项目(201601003).

作者简介: 丛超(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事饵料微藻研究. E-mail: cong03209@163.com

通信作者: 乔洪金(1983-), 男, 副研究员. E-mail: hongjinqiao@hotmail.com

多年是否发生了改变是未知的。此外, 筛选能够快速生长和 DHA、EPA 含量高的藻株对于水产养殖和生物燃料的开发具有重要价值^[17-18]。因此, 我们对 4 个品系的 *I. galbana* OA-3011 和一株 *I. galbana* FACHB-861 进行了生长率和脂肪酸含量的比较分析, 希望能够从中挑选出具有优良表型的品系进行选育。

1 材料与方法

1.1 品系及培养条件

实验中 4 个品系的 *I. galbana* OA-3011 来源于山东省莱州市(OA3011-LZ), 龙口市(OA3011-LK) 和青岛市(OA3011-QD)的不同养殖场和安源水产养殖有限公司(OA3011-AY), 这些品系均来自于同一株 *I. galbana* OA-3011。一个品系由中国科学院淡水藻种库提供(FACHB-861), 并在实验中作为对照。所有藻株用平板涂布法纯化, 通过接种 1 mL 培养物于含有 1.5% 的酵母提取物的 f/2 培养基检查细菌污染。

在 500 mL 的锥形瓶中加入 300 mL 的 f/2 培养基^[19], 进行灭菌前培养基的盐度和 pH 分别调整到 28 和 8.0。初始藻细胞密度为 5×10^5 cell/mL, 在光照振荡培养箱(100 r/min)中进行培养, 温度维持在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光强为 $60 \mu\text{mol}(\text{photons})/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期为 14 h/10 h(光/暗)。培养 6 d 后, 将培养物取样用于进一步分析。

1.2 18S rDNA 的测序

采用 CTAB 法提取各品系的基因组 DNA^[20], 并进行 18S rDNA 序列的 PCR 扩增^[21], PCR 产物送交上海生工生物工程有限公司直接进行测序。18S rDNA 通用 PCR 引物序列如下:

18N1: GGATCAGAATTCTATCTGGTTGATC
CTGCCAG, 18N11R: CTCAGTAAGCTTGATCCT
TCCGCAGGTTCCACC。

测得的 18S rDNA 序列以及自 NCBI 中搜索获得的两个同源序列使用 BioEdit 软件(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)中的 ClustalW multiple alignment 方法进行比对去除冗余序列。采用 Mega 5.0 软件^[22]中的邻位相接法(基于 Kimura's two-parameter 模型)构建系统进化树, 节点支持度采用靴带值法估计(1000 次重复)。

1.3 生长

每天取 2 mL 藻液记录 660 nm 的波长下的吸光度值(UV-2010 分光光度计, 日立, 日本)。利用线性回归方程将 OD_{660} 数值转化为生物量(表 1), 并用血球计数板(求精, 上海求精生化试剂仪器有限公司)在显微镜下计细胞个数。

1.4 生物量浓度测量

取 75 mL 培养藻液, 相同压力下经过 $0.45 \mu\text{m}$ 的玻璃纤维滤膜(津腾, 天津)过滤, 并用 10 mL 甲酸铵溶液(0.5 mol/L)洗涤以除去海水中的盐。用不含藻液的培养基作空白。过滤后的带有培养物的滤膜放入烘箱中, 100°C 下 4 h。在干燥器中冷却至室温后称重, 计算生物量浓度(BC)如下:

$$\text{BC} (\text{mg/L}) = (\text{DWA} - \text{DWC})/V$$

式中, DWA 为滤膜上的截留培养物平均干重(mg); DWC 为空白滤膜截留盐分的平均干重(mg); V 为藻液体积(L)。

1.5 脂肪酸甲酯(FAME)的分析

取培养藻液 200 mL, 转移到离心管中, 在 20°C 下 4000 g 离心 5 min。除去上清液, 将沉淀物收集并在 -20°C 下保存用于分析。

根据 Qiao 等^[23]的直接转酯法将冷冻样品中的脂质转化成脂肪酸甲酯(FAME), 然后通过气相色谱仪(GC-2010; 岛津制作所, 东京, 日本)进行检测, 取样量为 $1 \mu\text{L}$ 进入石英毛细管柱(Supelco 公司的 SP-2560: $100 \mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$, 薄膜厚度 $0.20 \mu\text{m}$), 载气为高纯氮气, 流速 1 mL/min , 分流比为 1 : 35, 烘箱温度最初在 140°C , 随后以 4°C/min 的速度上升到 240°C , 检测室温度为 260°C 。脂肪酸各成分通过与 37 种脂肪酸甲酯标准品(Supelco 公司, 贝尔丰特, 美国)的相对保留时间进行对比确定。

1.6 统计分析

所有结果以 3 组重复的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 除非另有规定。均值的比较采用 Duncan^[24]多重比较进行单因素方差分析。数据分析采用 SPSS11.0 (SPSS 公司, 芝加哥, 美国)。

2 结果与分析

2.1 18S rDNA 序列与进化树的构建

将测得的 5 个球等鞭金藻品系的 18S rDNA

序列提交 NCBI 后分别获得了以下登录号: KX980524(FACHB-861)、KX980523(OA3011-LK)、KX980522(OA3011-LZ)、KX980525(OA3011-AY)、KX980521(OA3011-QD)。进化树分析表明: 5 株球等鞭金藻品系均与 NCBI 中已有的 CCMP1324 藻株聚在一个分支上, 而与滨海等鞭金藻(*I. litoralis*)亲缘关系较远, 分歧明显; OA3011-LK、OA3011-LZ 和 OA3011-AY 聚在同一个分支(图 1), 分支靴带值支持度为 61%, 在可比对的区域相似性为 100%; FACHB-861 和 OA3011-QD 分别占据了一个分支, 表明二者与其他 3011 品系出现了分离。在可比对的区域, FACHB-861、OA3011-QD 分别与其他 OA3011 在同一位置出现了 1 次 A---G

转换, 而 FACHB-861 与 4 个 OA3011 品系在同一位置出现了 1 次 G---C 颠换(图 2)。

2.2 生长阶段

连续记录 6 d 培养藻液的吸光度值 OD_{660} , 发现培养 1 d 后所有的品系便进入指数生长期, 5 个品系指数生长期的结束时间不同, 培养的第 6 天, FACHB-861 和 OA3011-AY 生长缓慢, 并达到稳定期, 而其他 3 个品系仍然进行快速增长。在培养结束时 OA3011-LK 达到最高细胞密度(4.95×10^6 cell/mL), OA3011-AY 的细胞密度最低, 仅为 3.13×10^6 cell/mL。此外, FACHB-861 相比其他品系表现出了不同的生长模式, 在指数生长期后期具有较快的生长速度(图 3)。

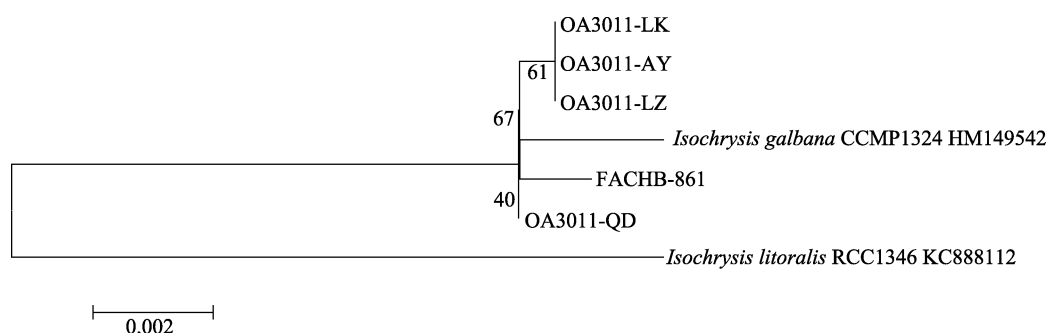


图 1 基于 18S rDNA 基因序列的球等鞭金藻品系进化树图

以滨海等鞭金藻为参照组, 分支上/下数字表示 1000 次重复计算出的靴带值, 比例尺为 0.2% 的变异率。

Fig. 1 The phylogenetic tree of *I. galbana* strains inferred from 18S rDNA gene sequences with *I. litoralis* as outgroup. Bootstrap values calculated with 1000 replicates are given adjacent to each node. Scale bar indicates 0.2% divergence.

FACHB-861 —TTCGAGCACCGGAGTAATGATTAACAGGGAC—
 OA3011-LZ —TTCGAGCACCGGAGTAATGGTTAACAGGGAC—
 OA3011-LK —TTCGAGCACCGGAGTAATGGTTAACAGGGAC—
 OA3011-AY —TTCGAGCACCGGAGTAATGGTTAACAGGGAC—
 OA3011-QD —TTCGAGCACCGGAGTAATGATTAACAGGGAC—
 —CAGATACCGTCGTAGTGTAAACCATAAACCA— FACHB-861
 —CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA— OA3011-LZ
 —CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA— OA3011-LK
 —CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA— OA3011-AY
 —CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA— OA3011-QD

图 2 5 个球等鞭金藻品系的 18S rDNA 序列碱基差异比较
 Fig. 2 Comparison of five strains of *I. galbana* on the base differences of 18S rDNA sequences

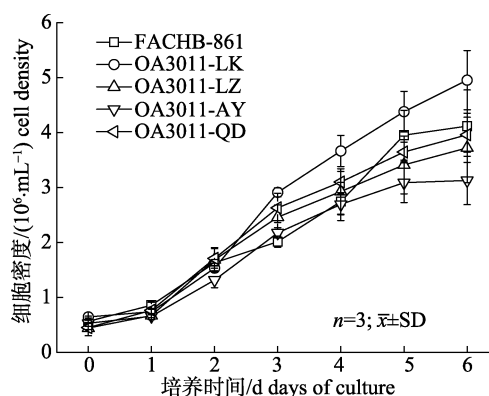


图 3 5 个球等鞭金藻品系的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of five strains of *I. galbana*

2.3 生物量

5 个品系的特异生长速率介于 0.31 至 0.38 之间(表 1), 没有显著差异。然而, OA3011-LK 和

OA3011-AY 的生物量分别为(53.78 ± 4.29) mg/L 和 (59.11 ± 5.05) mg/L, 显著低于 OA3011-LZ 和 FACHB-861($P < 0.05$)。

表 1 5 个品系球等鞭金藻的特定生长率及生物量
Tab. 1 Specific growth rate and biomass concentration of five strains of *I. galbana*

品系 strain	特异生长速率/d ⁻¹ specific growth rate	生物量/(mg·L ⁻¹) biomass concentration	线性回归方程 linear regression
FACHB-861	0.31±0.01	85.65±14.46 ^a	y=13.71x-0.06, R ² =0.9906
OA3011-LK	0.38±0.03	53.78±4.29 ^b	y=16.87x-0.09, R ² =0.9955
OA3011-LZ	0.34±0.04	78.22±10.86 ^{ac}	y=13.85x-0.33, R ² =0.9923
OA3011-AY	0.31±0.03	59.11±5.05 ^b	y=11.86x+0.01, R ² =0.9960
OA3011-QD	0.33±0.06	61.33±10.91 ^{bc}	y=15.16x-0.35, R ² =0.9973

注: 不同上标表示差异显著性(单因素方差分析, Duncan 检验; $P<0.05$).
Note: Different superscripts indicate significant difference among five *I. galbana* strains (ANOVA, Duncan's test; $P<0.05$).

2.4 总脂肪酸含量

OA3011-LK, OA3011-QD 和 OA3011-AY 总脂肪酸含量较高,分别为(96.76±17.70) mg/g, (92.75±22.95) mg/g, (87.91±25.80) mg/g, 没有显著差异($P>0.05$)。然而, FACHB-861 和 OA3011-LZ 的总脂肪酸含量分别为(52.11±18.20) mg/g 和(66.42±3.50) mg/g, 显著低于 OA3011-LK、OA3011-QD 和 OA3011-AY ($P<0.05$)(图 4)。

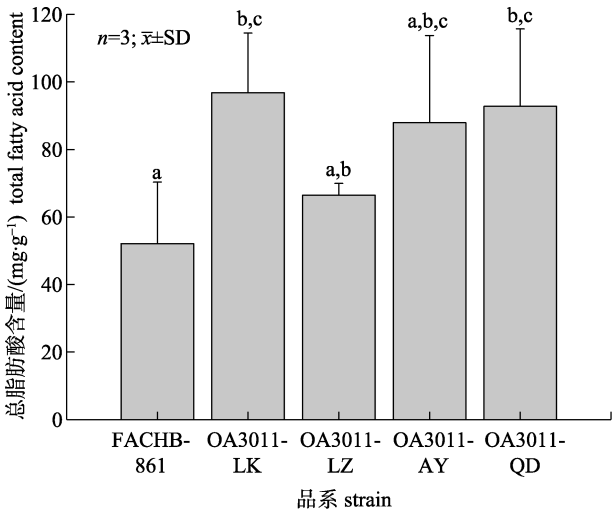


图 4 5 个球等鞭金藻品系的总脂肪酸含量
不同上标表示品系间差异显著性(单因素方差分析, Duncan 检验; $P<0.05$).

Fig. 4 TFA production of five *I. galbana* strains
Different superscripts indicate significant difference among five *I. galbana* strains (ANOVA, Duncan's test; $P<0.05$).

2.5 脂肪酸组分

5 个品系的脂肪酸主要组分是 $C_{14:0}$ (12.49%~14.61%), $C_{16:0}$ (9.75%~13.02%), $C_{18:1n-9}$ (11.77%~24.60%), $C_{18:2n-6}$ (2.50%~6.94%), $C_{18:3n-3}$ (3.67%~

6.98%), $C_{18:4n-3}$ (9.36%~23.79%)和 DHA (9.68%~12.32%)(表 2)。与 OA-3011 各品系相比, FACHB-861 在 $C_{16:0}$, $C_{16:1n-7}$, $C_{18:1n-9}$, $C_{18:1n-7}$, $C_{18:2n-6}$, $C_{18:3n-3}$, $C_{18:4n-3}$, $C_{22:0}$, MUFA(单不饱和脂肪酸)和 PUFA(多不饱和脂肪酸)含量上具有显著差异($P<0.05$), 具有较高的 $C_{18:1n-9}$ 和较低的 $C_{18:4n-3}$ 。

5 个品系的 DHA 含量和 EPA 含量相差极大(表 2)。EPA 含量范围从 0.20% (OA3011-LZ)至 1.42% (OA3011-QD)。DHA 含量从 9.68%到 12.32%, OA3011-QD 最高, 而 OA3011-LZ 最低。OA3011-LZ 和 OA3011-AY 的 DHA/EPA 分别为 48.99 ± 2.82 和 30.04 ± 3.42 , 显著高于其他品系, 而 OA3011-QD 和 FACHB-861 具有相似的 DHA/EPA, 分别为 8.76 ± 1.76 和 8.70 ± 0.61 , 均显著低于其他品系($P<0.05$)。

2.6 细胞终密度、生物量与总脂肪酸含量的相关性分析

如表 3 所示, 对所有 5 个品系的细胞终密度、生物量与总脂肪酸含量相互关系进行了 Pearson 相关性分析, 细胞密度分别与生物量、总脂肪酸含量之间无显著相关性, 而生物量和总脂肪酸含量之间存在着极显著的负相关性($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 种属关系

通过进化树的结果可以看出, 球等鞭金藻这一藻种在其内部存在着藻株的明显分化, FACHB-861 与 OA3011-QD 与其他 OA3011 品系出现了明显的分离, 这种进化关系上的分离为其表型的多样性提供了可能。

表 2 5 个品系的球等鞭金藻脂肪酸组分的分析
Tab. 2 Fatty acid composition analysis of five *I. galbana* strains

$n=3$; $\bar{x} \pm SD$; %; 以总脂肪酸计 based on total fatty acids content

脂肪酸 fatty acid	FACHB-861	OA3011-LK	OA3011-LZ	OA3011-AY	OA3011-QD
C _{14:0}	13.61±1.13 ^{ab}	12.49±1.18 ^a	14.40±0.57 ^b	13.96±0.53 ^{ab}	14.61±0.39 ^b
C _{16:0}	13.02±0.57 ^c	10.49±0.38 ^a	9.75±0.85 ^a	10.23±0.26 ^a	11.64±0.38 ^b
C _{16:1n-7}	2.11±0.09 ^a	3.36±0.11 ^c	2.89±0.08 ^b	3.18±0.11 ^c	4.71±0.26 ^d
C _{16:3}	0.29±0.03 ^a	0.65±0.04 ^b	0.56±0.10 ^b	0.80±0.05 ^c	0.31±0.04 ^a
C _{18:0}	1.12±0.09 ^b	1.08±0.27 ^{ab}	0.80±0.23 ^{ab}	0.73±0.10 ^a	0.78±0.21 ^{ab}
C _{18:1n-9}	24.60±0.93 ^c	12.02±0.66 ^a	15.09±0.42 ^b	11.77±0.22 ^a	14.21±1.00 ^b
C _{18:1n-7}	1.77±0.17 ^c	1.34±0.14 ^{ab}	1.31±0.09 ^a	1.56±0.02 ^{bc}	1.42±0.10 ^{ab}
C _{18:2n-6}	6.94±0.64 ^d	2.50±0.01 ^a	3.46±0.41 ^c	3.15±0.16 ^{bc}	2.76±0.08 ^{ab}
C _{18:3n-3}	3.67±0.34 ^a	6.98±0.28 ^c	6.88±0.40 ^c	6.89±0.43 ^c	6.23±0.17 ^b
C _{18:4n-3}	9.36±0.74 ^a	23.79±0.99 ^c	22.36±1.01 ^c	23.31±0.79 ^c	19.04±0.70 ^b
C _{22:0}	0.96±0.10 ^a	0.37±0.02 ^b	0.48±0.05 ^c	0.30±0.02 ^d	0.23±0.02 ^c
C _{20:3n-3}	1.18±0.25 ^{ab}	1.20±0.09 ^a	0.89±0.02 ^c	0.97±0.11 ^{bc}	0.97±0.05 ^{abc}
EPA	1.30±0.19 ^a	0.61±0.10 ^b	0.20±0.02 ^c	0.37±0.02 ^d	1.42±0.08 ^a
DHA	11.2±0.50 ^{bc}	10.45±1.01 ^{ab}	9.68±0.54 ^a	11.10±0.74 ^{bc}	12.32±0.21 ^c
others	8.86±1.88 ^a	11.54±0.22 ^c	11.26±0.59 ^{bc}	11.69±1.41 ^c	9.35±0.62 ^{ab}
SFA	28.72±1.24 ^c	24.43±1.78 ^a	25.43±0.70 ^{ab}	25.22±0.74 ^{ab}	27.26±0.23 ^{bc}
MUFA	28.47±1.07 ^c	16.72±0.64 ^a	19.28±0.26 ^b	16.51±0.31 ^a	20.33±0.70 ^b
PUFA	33.65±1.40 ^a	45.53±1.56 ^c	43.47±1.14 ^{bc}	45.78±1.56 ^c	42.75±0.82 ^b
DHA/EPA	8.76±1.76 ^a	17.20±2.03 ^b	48.99±2.82 ^d	30.04±3.42 ^c	8.70±0.61 ^a

注：同一栏不同上标表示品系间差异显著(单因素方差分析, Duncan 检验; $P<0.05$).
Note: Different superscripts indicate significant difference among five *I. galbana* strains (ANOVA, Duncan's test; $P<0.05$).

表 3 细胞终密度、生物量和总脂肪酸含量的 Pearson 相关性分析
Tab. 3 Pearson analysis of final cell density, biomass and total fatty acid content

项目 item	细胞终密度 final cell density	生物量 biomass	总脂肪酸含量 total fatty acid
细胞终密度 final cell density	1	-0.016	0.014
生物量 biomass	-0.016	1	-0.796**
总脂肪酸含量 total fatty acid	0.014	-0.796**	1

注：数值为 Pearson 相关系数，“*”表示显著性相关 $P<0.05$ ，“**”表示极显著性相关 $P<0.01$.
Note: Data was Pearson correlation coefficient; “*”indicates significant correlation, $P<0.05$; “**”indicates significant correlation, $P<0.01$.

3.2 生长和生物量

本研究中的 5 个品系比生长速率在 0.31~0.38, 并且都具有快速生长的特点, 培养 4~5 d 后便进入稳定期. 这与 Kain 和 Fogg^[25]对 *I. galbana* Parke 的研究一致, 该研究显示比生长速率在 0.25~0.55, 并在 4~6 d 结束指数生长期, 然而, 本实验中生物量为 59.11~85.65 mg/L, 比 Liu 等^[26]研究的不同品系和不同品种的 *Isochrysis* 的生物量 (0.49~5.24 g/L) 低得多. 这些差异可能主要是由以下因素引起的: 1) 培养容器的差异, 锥形瓶或光生物反应器; 2) 培养基的成分差异; 3) 起始浓度的不同;

4) 培养方法不同, 非连续或者连续培养; 5) 使用的品种或者品系差异.

在生长模式和生物量方面, FACHB-861 的生长曲线与其他品系明显不同, 并且具有最高的生物量. 同时, OA-3011 各品系间也表现出比较显著的差异, OA3011-LK 和 OA3011-AY 的生物量显著低于 OA3011-LZ ($P<0.05$), 这表明该品系可能已经发生了分化.

3.3 总脂肪酸含量

关于 *Isochrysis* 属的某些品种或品系的总脂肪酸含量已有大量研究, 例如 *I. aff. galbana* T-ISO

的生物量为 101.9 mg/g 干重^[27], *I. galbana* AII4 为 55.5 mg/g 干重^[28-29], 还有一些 *I. galbana* 生物量为 178.6~238.1 mg/g 干重^[30], 105.8 mg/g 干重^[31], 97.1~118.1 mg/g 干重^[26]等等, 大多数结果与本实验的 52.11~96.76 mg/g 干重基本一致。

3.4 脂肪酸

本实验中, *I. galbana* 的 DHA 含量占总脂肪酸含量为 9.68% 到 12.32%, 在 Liu 等^[26]的结果 3.6% 至 17.5% 之间。虽然实验结果显示 EPA 含量明显较低, 但不同品系 *I. galbana* 的 EPA 含量有着显著差异。以往的研究中存在两种类型的 *I. galbana*, 一类 DHA 含量高于 EPA 含量, 例如 *I. aff. galbana* T-ISO^[26, 32-35]; 另一类 DHA 含量低于 EPA, 例如 Parke 分离的 *I. galbana* Parke clon ISO^[8-9, 28-29, 36-37]。在本研究中所用的 5 个品系显然属于前者。

根据 C_{18:1n-9} 和 C_{18:4n-3} 的百分比含量, 在这项研究中的 5 个品系的 *I. galbana* 能够分成两组, FACHB-861 和 OA-3011, 品系的名称恰好响应了其脂肪酸的组成。然而, 在 OA-3011 各品系的脂肪酸组成中也发生了一些小的变化, 例如 OA3-011-QD 的 EPA 含量比其他 3011 品系要高得多, 这与其在分子鉴定上与其他 OA3011 品系分离的结果一致(图 1)。Alonso 等^[8]分析了 59 个 *I. galbana* 的单克隆后, 发现单克隆之间脂肪酸具有明显差异, 并且指出, 这些变化很可能是由单克隆的遗传变异造成的^[38]。本实验研究的 OA3011 品系中类似的表型变异也出现在 C_{14:0}、C_{18:1n-9}、C_{18:4n-3}、EPA 和 DHA 中, 这说明在 *I. galbana* 中存在着广泛而频繁的表型变异。

3.5 细胞终密度、生物量与总脂肪酸含量的相关性

细胞终密度与生物量之间无显著相关性, 表明 5 个品系的细胞个体重量并非均一大小, 细胞个体的大小在品系之间呈现出多样性; 而生物量与总脂肪酸含量的极显著负相关表明了球等鞭金藻积累生物量的特点, 即生物量升高脂肪酸下降, 生物量下降则积累脂肪酸, 这与缺氮条件下生物量下降而脂肪含量提高的报道一致^[39-40], 也表明不同品系呈现出不同的生长策略。

3.6 遗传变异

Wikfors^[41]观察到甾和烯酮含量不同的同种

Isochrysis 对温度的耐受性、生化组成以及对无脊椎动物的营养价值方面具有差异。在本研究中, 我们也观察到同种甚至同一品系 *I. galbana* 在生长, TFA 含量和脂肪酸组成上的差异。近日, 有报道证实在定鞭藻门(Haptophyte)的等鞭金藻目 Isochrysidales 的许多物种存在世代交替的有性繁殖现象^[42-45]。Young 等^[46]甚至认为, 这种同源性状可能存在于整个定鞭藻门。虽然目前仍然没有直接的证据表明 *I. galbana* 具有有性生殖过程, 但本实验的不同品系间表型的差异说明了遗传变异的存在, 并且可能产生于有性生殖的同源重组过程中, 关于这点还有待进一步研究。

4 结论

本研究结果表明地理隔离能够使 *I. galbana* 产生性状上的差异, 从而可以对其进行选育。根据生长速度, 高 DHA、EPA 和多不饱和脂肪酸含量等选育标准, 我们的初步实验结果显示, 可以对 OA3011-LK 及 OA3011-QD 进行进一步选育。

参考文献:

- [1] Shi T, Yu A, Li M, et al. Identification of a novel C22-Δ4-producing docosahexaenoic acid (DHA) specific polyunsaturated fatty acid desaturase gene from *Isochrysis galbana* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Lett, 2012, 34(12): 2265-2274.
- [2] Gladyshev M I, Sushchik N N, Makhutova O N. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land[J]. Prostagl Lip Mediat, 2013, 107: 117-126.
- [3] Reitan K I, Rainuzzo J R, Øie G, et al. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae[J]. Aquaculture, 1997, 155(1): 207-221.
- [4] Muller-Feuga A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends[J]. J Appl Phycol, 2000, 12(3-5): 527-534.
- [5] Servel M O, Claire C, Derrien A, et al. Fatty acid composition of some marine microalgae[J]. Phytochemistry, 1994, 36(3): 691-693.
- [6] Volkman J K, Smith D J, Eglinton G, et al. Sterol and fatty acid composition of four marine Haptophycean algae[J]. J Mar Biol Assoc UK, 1981, 61(2): 509-527.
- [7] Volkman J K, Jeffrey S W, Nichols P D, et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in

- mariculture[J]. J Experim Mar Biol Ecol, 1989, 128(3): 219–240.
- [8] Alonso L, Grima E M, Pérez J A S, et al. Fatty acid variation among different isolates of a single strain of *Isochrysis galbana*[J]. Phytochemistry, 1992, 31(11): 3901–3904.
- [9] Alonso D L, Grima E M, Pérez J A S, et al. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid[J]. Aquaculture, 1992, 102(4): 363–371.
- [10] Fradique M, Batista A P, Nunes M C, et al. *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source[J]. LWT-Food Sci Technol, 2013, 50(1): 312–319.
- [11] Freitas L, Lodeiros C, Guevara M, et al. Fatty acids profiles as selecting criteria of microalgal diets used for hatchery-rearing of the tropical scallop *Euvola ziczac*[J]. Aquac Res, 2016, 47(8): 2670–2676.
- [12] Jamali H, Ahmadifard N, Abdollahi D. Evaluation of growth, survival and body composition of larval white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the combination of three types of algae[J]. Internat Aquat Res, 2015, 7(2): 115–122.
- [13] Scott A P, Middleton C. Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae—the importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids[J]. Aquaculture, 1979, 18(3): 227–240.
- [14] Rhodes E W, Landers W S. Growth of oyster larva *Grasorted virginica* of various sizes in different concentrations of the Chrysophyte *Isochrysis galbana*[J]. Proceed Nation Shellfish Assoc, 1973, 63: 53–59.
- [15] Zhang L, Li L, Liu J. Comparison of the photosynthetic characteristics of two *Isochrysis galbana* strains under high light[J]. Botanica Mar, 2014, 57(6): 477–481.
- [16] Chen J F, Pan Y Y. Studies on the growth of *Isochrysis galbana* Parke and its nutrient component[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1987, 18(1): 55–63. [陈椒芬, 潘永尧. 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究[J]. 海洋与湖沼, 1987, 18(1): 55–63.]
- [17] Chepurnov V A, Chaerle P, Roef L, et al. Classical breeding in diatoms: scientific background and practical perspectives [M]//The Diatom World. Amsterdam: Springer, 2011: 167–194.
- [18] Borowitzka M A. Species and strain selection[M]//Borowitzka M A, Moheimani N R. Algae for Biofuels and Energy. Amsterdam: Springer, 2013: 77–89.
- [19] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (CLEVE) Gran[J]. Can J Microbiol, 1962, 8(2): 229–239.
- [20] Chen Y, Liu G Q, Li W B, et al. Comparison of three extraction methods for DNA from *Chlorella* spp.[J]. Plant Physiology Communications, 2001, 37(3): 242–244. [陈颖, 刘根齐, 李文彬, 等. 3 种小球藻 DNA 提取方法的比较[J]. 植物生理学报, 2001, 37(3): 242–244.]
- [21] Qiao H, Wang G, Zhang X. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth[J]. J Phycol, 2009, 45(5): 1153–1162.
- [22] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molec Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [23] Qiao H, Wang J, Zhang L, et al. An improved direct transesterification method for fatty acid determination of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. J Appl Phycol, 2015, 27(2): 697–701.
- [24] Duncan D B. Multiple range and multiple F tests[J]. Biometrics, 1955, 11(1): 1–42.
- [25] Kain J M, Fogg G E. Studies on the growth of marine phytoplankton I. *Asterionella japonica* Gran[J]. J Mar Biolog Assoc UK, 1958, 37(2): 397–413.
- [26] Liu J, Sommerfeld M, Hu Q. Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(11): 4785–4798.
- [27] Burgess J G, Iwamoto K, Miura Y, et al. An optical fibre photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis aff. galbana* T-Iso (UTEX LB 2307) rich in docosahexaenoic acid[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39(4–5): 456–459.
- [28] Grima E M, Pérez J A S, Camacho F G, et al. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41(1): 23–27.
- [29] Grima E M, Camacho F G, Pérez J A S, et al. Biochemical productivity and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* Parke and *Tetraselmis* sp. as a function of incident light intensity[J]. Proc Biochem, 1994, 29(2): 119–126.
- [30] Vazhappilly R, Chen F. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth[J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(3): 393–397.
- [31] Lin Y H, Chang F L, Tsao C Y, et al. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor[J]. Biochem Engin J, 2007, 37(2): 166–176.

- [32] Sukenik A, Wahnon R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*[J]. Aquaculture, 1991, 97(1): 61–72.
- [33] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1[J]. J Appl Phycol, 1997, 9(5): 451–457.
- [34] Pernet F, Tremblay R, Demers E, et al. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system[J]. Aquaculture, 2003, 221(1): 393–406.
- [35] Patil V, Källqvist T, Olsen E, et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed[J]. Aquaculture International, 2007, 15(1): 1–9.
- [36] Molina Grima E, Sánchez Pérez J A, García Sánchez J L, et al. EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity[J]. Proc Biochem, 1992, 27(5): 299–305.
- [37] Fidalgo J P, Cid A, Torres E, et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*[J]. Aquaculture, 1998, 166(1): 105–116.
- [38] Alonso D L, del Castillo C I S, Sánchez J L G, et al. Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)[J]. J Phycol, 1994, 30(3): 553–558.
- [39] Flynn K J, Zapata M, Garrido J L, et al. Changes in carbon and nitrogen physiology during ammonium and nitrate nutrition and nitrogen starvation in *Isochrysis galbana*[J]. Europ J Phycol, 1993, 28(1): 47–52.
- [40] Roopnarain A, Gray V M, Sym S. Influence of nitrogen stress on *Isochrysis galbana* strain U4, a candidate for biodiesel production[J]. Phycolog Res, 2014, 62(4): 237–249.
- [41] Wikfors G H, Patterson G W. Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture[J]. Aquaculture, 1994, 123(1–2): 127–135.
- [42] Houdan A, Billard C, Marie D, et al. Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: Flow cytometric analysis of relative ploidy levels[J]. System Biodiv, 2004, 1(4): 453–465.
- [43] Frada M, Percopo I, Young J, et al. First observations of heterococcolithophore–holococcolithophore life cycle combinations in the family Pontosphaeraceae (Calcihaptophycidae, Haptophyta)[J]. Mar Micropaleontol, 2009, 71(1): 20–27.
- [44] Frada M J, Bidle K D, Probert I, et al. *In situ* survey of life cycle phases of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Haptophyta)[J]. Environm Microbiol, 2012, 14(6): 1558–1569.
- [45] Bendif E M, Young J. On the ultrastructure of *Gephyrocapsa oceanica* (Haptophyta) life stages[J]. Cryptog Algal, 2014, 35(4): 379–388.
- [46] Young J R, Geisen M, Probert I. A review of selected aspects of coccolithophore biology with implications for paleobiodiversity estimation[J]. Micropaleontology, 2005, 51(4): 267–288.

Intraspecific variability in growth and fatty acid composition among five strains of *Isochrysis galbana*

CONG Chao^{1,2}, HU Dongxue^{1,2}, SUN Chunxiao^{1,2}, QIAO Hongjin², WANG Jiying², ZHANG Limin²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China

Abstract: *Isochrysis galbana* is an excellent unicellular bait for the larvae of many aquaculture animals. Thus, screening for *I. galbana* strains with rapid growth rate and high content of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) is very important for the breeding of aquaculture animals. However, most of the *I. galbana* strains in China have been derived from a common ancestor called *I. galbana* OA-3011, and different strains of *I. galbana* have been developed after a long duration of geographical isolation. Whether the traits of these strains have changed or not remains unknown. In order to evaluate the status of the phenotypic traits of different geographic isolates for future selective breeding, comparative analysis of five strains of *I. galbana* (FACHB-861, OA3011-QD, OA3011-LK, OA3011-AY, and OA3011-LZ) with regard to their taxonomy, growth, and fatty acid composition was conducted. Different strains were cultured under identical conditions for six days until they reached a stationary phase. Genomic DNA was extracted for polymerase chain reaction sequencing of the 18S rDNA gene. The OD₆₆₀ was recorded daily for plotting a growth curve. When the cultures reached stationary phase, they were harvested by high-speed centrifugation for biomass determination and fatty acid analysis by using gas chromatography. Phylogenetic analysis of the 18S rDNA gene suggested that FACHB-861 was distantly related with the OA-3011 strains. OA3011-LK, OA3011-AY, and OA3011-LZ had identical 18S rDNA sequences, but the 18S rDNA sequence of OA3011-QD differed from that of the other OA-3011 strains at one position, resulting in a single base substitution. The growth curve showed that the five strains reached stationary phase at different times. FACHB-861 showed a distinct pattern of growth, unlike the other four OA-3011 strains. The final biomass concentrations were significantly different between *I. galbana* FACHB-861 and OA-3011 strains as well as among OA3011-LK, OA3011-AY, and OA3011-LZ ($P < 0.05$), whereas the growth rates were not significantly different among the strains ($P > 0.05$). The total fatty acid content of FACHB-861 and OA3011-LZ were significantly lower than that of OA3011-LK, OA3011-QD, and OA3011-AY ($P < 0.05$). The fatty acid profile of FACHB-861 was remarkably different from that of the OA-3011 strains. However, a conspicuous variation in fatty acid compositions was also observed among OA-3011 strains, indicating a wide and frequent quantitative phenotypic variation among the strains of *I. galbana*. These variations resulting from geographic isolation might provide a feasible method for the selective breeding of *I. galbana* strains. According to the screening criteria such as growth rate or DHA, EPA, and polyunsaturated fatty acid content, our preliminary analysis showed that OA3011-LK, which has the highest growth rate, and OA3011-QD, which contains the highest amount of DHA, are promising candidates for further screening.

Key words: *Isochrysis galbana*; strain; growth; fatty acid; genetic variation

Corresponding author: QIAO Hongjin. E-mail: hongjinqiao@hotmail.com