

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201404029

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 HQ, LIN XY, PAN YH. EMS mutagenesis of *Chlorella* and the conditions of producing EPA research [J]. *Guihaia*, 2016, 36(3):355-360

小球藻的甲基磺酸乙酯诱变及产 EPA 的条件研究

刘红全*, 林小园, 潘艺华

(广西民族大学 海洋与生物技术学院, 微生物与植物资源利用广西高校重点实验室, 南宁 530006)

摘要: 小球藻是海水养殖系统中常用的单细胞微藻, 繁殖能力强, 易于规模化培养, 且可合成不饱和脂肪酸 EPA、DHA 等多种活性物质, 在医疗和保健品开发中具有很高的应用价值。目前商业化培养的藻种多从自然界中直接获得, 活性物质的产量较低且藻种易退化。为了获得 EPA 产量更高的藻种, 该研究利用 0.6% EMS 对小球藻进行诱变, 利用尼罗红染色法进行初筛并通过单细胞分离技术得到 1 株突变株 EC1, 通过气象色谱测定其 EPA 产量。结果表明: 与出发藻株相比, 突变株 EPA(二十碳五烯酸)产量提高了 8.97%。根据单因素试验确定突变株生长及产 EPA 的合适培养条件, 再通过正交试验筛选出培养条件的优化组合, 表明突变藻 EC1 株产 EPA 的较适条件为 NaNO_3 75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.5, 昼夜温度 17~15 $^{\circ}\text{C}$, 接种量为 12%, 在此条件下培养 7 d 其 EPA 的产量可达 25.38 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 传代实验表明突变藻株具有较好的遗传稳定性。该研究结果为进一步利用小球藻规模化生产 EPA 奠定了基础。

关键词: 小球藻, EMS 诱变, EPA

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)03-0355-06

EMS mutagenesis of *Chlorella* and the conditions of producing EPA research

LIU Hong-Quan*, LIN Xiao-Yuan, PAN Yi-Hua

(College of Ocean and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Key Laboratory of Microorganisms and Plants Resources Utilization of Guangxi Colleges and Universities, Nanning 530007, China)

Abstract: *Chlorella vulgaris* is a single-cell microalgae and most frequently used in aquaculture because it is easy for large-scale cultivation and could generate PUFAs such as EPA and DHA, which possess high value in medical and health care products. But the microalgae for commercial training were directly obtained from the nature, whose active material production was low and easy to degradate. In order to obtain algal strains of high EPA production, *C. vulgaris* was mutated by 0.6% EMS. Using Nile red staining for preliminary screening and then selected by single-cell clone method, the mutant strain EC1 was isolated from 200 mutant clones. The EPA yield of EC1 was measured by gas chromatography. The yield increased by 8.97% compared with the parent strain. The appropriate condition for the mutant strain culturing and its EPA production was determined by single factor experiment. Then the optimize condition assembly was determined by orthogonal test. The most suitable culture conditions for EPA production of EC1 included NaNO_3 75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.5, day-night temperature 17-15 $^{\circ}\text{C}$, 12% inoculation quantity and training for 7 d. The EPA yield of EC1

收稿日期: 2014-12-16 修回日期: 2015-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(30960215); 广西自然科学基金(桂科青 0728019); 广西民族大学相思湖青年学者创新团队资助项目[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30960215); Natural Science Foundation of Guangxi(0728019); Xiangsihu Young Scholars Innovative Research Team of Guangxi University for Nationalities(2014)]。

作者简介: 刘红全(1975-), 男, 黑龙江肇东人, 博士, 副教授, 从事生物化学及遗传学的教学和科研工作, (E-mail)lhongquan@163.com。

* 通讯作者

could reach $25.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ under the suitable culture condition. The results of subculture test showed that the mutant strain possessed good hereditary stability. The EPA yield showed no significant difference from the first generation to the sixth generation. The research would lay the foundation for the utilization of the *C. vulgaris*.

Key words: *Chlorella vulgaris*, EMS mutagenesis, EPA

小球藻是海水养殖系统中最常用的单细胞微藻,不仅营养价值含量高、富含不饱和脂肪酸,且繁殖能力强,易于室内或户外规模化培养(Pernet et al, 2003; Liang et al, 2006)。随着研究的深入,微藻的商业化价值迅速提高,如用作食品添加剂,药效成分,不饱和脂肪酸,染料,污水处理及绿色能源(Perez-Garcia et al, 2011)。目前,大多数生产厂采用的藻种多为从自然界直接分离获得,性状单一、稳定,藻种易退化等问题,使得微藻的产量及生物活性物质含量无法满足人们日益增长的需求(扬世杰等, 1988)。因此有必要改进海洋微藻的育种技术,从而对微藻的种质进行改良以培养出生长速度快,不饱和脂肪酸产量高的新品种。

海洋微藻的诱变育种方法一般采用紫外线, γ -射线, EMS(甲基磺酸乙酯), 细胞融合及转基因等,引起细胞核染色体断裂, 碱基缺失、置换、重组等生物学效应,使后代性状发生变异,获得可应用于微藻养殖和加工的新品系(王妮等, 2009)。其中 EMS(甲基磺酸乙酯)化学诱变技术在国内外已公认为一种有效、成熟的技术,价格便宜,操作简单,引起突变的范围广,在作物育种中得到广泛应用(降云峰等, 2012)。本研究通过 EMS 诱变以期筛选出生长速度快、油脂含量高、可供开发利用的小球藻新株系。

1 材料与方 法

1.1 藻种

所用藻种购买于武汉中科院水生生物研究所,绿藻门的小球藻(*Chlorella vulgaris*)。

1.2 培养条件

在 250 mL 三角瓶内装 100 mL 的培养液, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压下灭菌 20 min。培养温度 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 ($4 \times 40 \text{ W}$ 日光灯照射), 光暗周期为 12h/12h。培养液采用 F/2 配方配制, 人工海水的配方参考陈百灵(2011)的稍作改进。每天振摇 2~3 次, 藻悬液长到指数生长后期时, 用于试验。

1.3 甲基磺酸乙酯(EMS)的诱变

1.3.1 EMS 诱变的预实验 取处于对数生长期的藻

液 10 mL, 离心收集藻细胞。所得藻细胞分别放入浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的 EMS 溶液(用 $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7 的磷酸缓冲液配制)中悬浮至 10 mL, 处理 30 min。加入 1 mL 硫代硫酸钠(5%)终止诱变反应。离心去除诱变液, ddH₂O 冲洗 1 次, 新鲜营养液洗涤 2 次, 避光 12 h。培养 1 d 后测定细胞的致死率同时将藻液进行扩大培养, 测定比生长速率。根据致死率和比生长速率确定合适的诱变剂浓度。

1.3.2 EMS 诱变及突变株的筛选 以预试验中确定的诱变剂量对出发株诱变。诱变后将全部藻液转移到 50 mL 三角瓶中, 遮光 12 h, 3 d 后将藻液涂布在固体培养基上, 12 d 后分别挑取体积较大、浓绿色的藻落 200 株于 50 mL 的培养液中。

利用尼罗红染色法进行初筛。尼罗红是一种脂溶性荧光染色剂, 通过染色选择合适的激发波长和自发波长可测定细胞内的油脂含量, 细胞经染色后的荧光强度与细胞内油脂含量显著相关(Else y et al, 2001; Van et al, 2005)。取 1 mL 细胞密度为 10^6 的藻液, 加入尼罗红染料 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 将染色好的藻细胞滴入载玻片中, 于荧光显微镜下观察细胞中脂滴的大小和数量(Cben et al, 2009; Nasrin et al, 2011)。

筛选出的藻株接种到 150 mL 培养液中培养, 每隔 1 d 计算细胞密度, 10 d 后离心, 烘干, 测定脂肪酸含量。根据终细胞密度及脂肪酸含量筛选出一株优良藻株, 进行后续工作。

1.4 突变藻株产 EPA 条件的优化

1.4.1 NaNO₃ 浓度对诱变株生长及产 EPA 的影响 NaNO₃ 浓度设置 5 个梯度: 0、37.5、75、102.5 和 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余培养条件不变。隔天测细胞密度, 待藻细胞长到稳定期后, 提取 EPA。

1.4.2 pH 对诱变藻株生长及产 EPA 的影响 pH 设置 5 个梯度: 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 其余培养条件不变。隔天测细胞密度, 待藻细胞长到稳定期后, 提取 EPA。

1.4.3 温度对诱变藻株生长及产 EPA 的影响 温度设置 5 个梯度: 17、20、23、25、27 和 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 为 7.5,

其余培养条件不变。隔天测细胞密度,待藻细胞长到稳定期后,提取 EPA。

1.4.4 接种量、培养天数及昼夜温差对诱变藻株产 EPA 的交互影响 根据单因素实验中微藻生长及产 EPA 的条件差异,选择合适的培养条件,通过正交试验筛选出培养条件的优化组合(表 1)。

表 1 试验因子及其水平

Table 1 Experimental factors and their levels

因子 Factor	水平 1 Level I	水平 2 Level II	水平 3 Level III
昼夜温度(°C) Temperature of day-night	17~15	20~18	23~21
接种量(%) Inoculum dose	8	10	12
培养天数(d) Culture days	7	10	13

pH 为 7.5,其余培养条件不变。每个试验重复 3 次,隔天测细胞密度,求平均值。

1.5 遗传稳定性分析

将筛选得到的诱变株连续转接 6 代,测定第一代和第六代的 EPA 含量,看是否能稳定遗传。

1.6 不饱和脂肪酸的提取及气象色谱测定

1.6.1 采用甲醇-氯仿提取法 参考陈炜等(2010)采用氯仿-甲醇混溶液(2:1, v/v)超声提取粗脂肪酸,将粗提液加入等体积的 1 mol·L⁻¹的 KOH-CH₃OH 混溶液于 75 °C 水浴中皂化,用正己烷萃取后用气相色谱测定,在整个操作过程中需充 N₂ 保护不饱和脂肪酸不被氧化。

1.6.2 脂肪酸的色谱测定 用日本岛津的气相色谱仪,60 m × 0.32 mm × 0.25 μm 石英毛细管柱,汽化室和检测器的温度均为 250 °C,色谱柱的升温程序为初始 70 °C,以 30 °C·min⁻¹的速率升至 150 °C,然后以 5 °C·min⁻¹升到 250 °C,保持到所测样品的峰值都出现。载气为高纯 N₂,流速 30 mL·min⁻¹,H₂ 流速为 40 mL·min⁻¹,空气流速为 450 mL·min⁻¹,分流比为 1:60,进样量 1 μL。通过与标准脂肪酸保留时间的对比鉴别各脂肪酸组分,面积归一化法计算出所需脂肪酸的相对含量。

2 结果与分析

2.1 EMS 的诱变结果

在 EMS 诱变处理中,随着浓度的增加微藻的颜色逐渐变浅,当浓度达到 1.0% 时藻液出现大量浅白色的糝状固体。待细胞死亡稳定后测定致死率结

果如图 1。

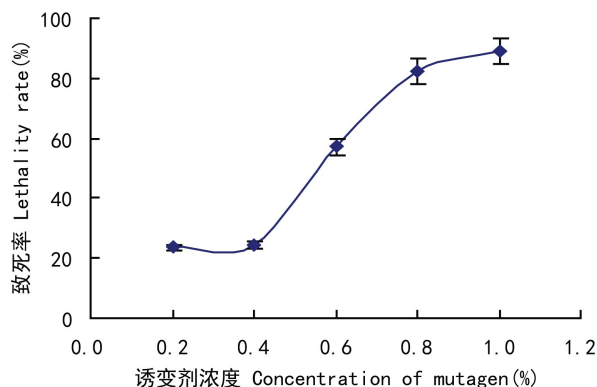


图 1 EMS 诱变处理后小球藻的致死率

Fig. 1 Lethality rate of EMS on the *Chlorella Vulgaris*

从图 1 看出,随诱变剂浓度的增大,小球藻的存活率急剧下降,通过方差分析诱变剂浓度对微藻的致死效应呈显著性差异($P=0.0007$)。当浓度处于 0.4%~0.8% 之间时,致死率倍增,说明此时的诱变剂浓度是处于多数细胞的敏感区域与耐受极限。经过 EMS 处理后,小球藻的生长受到不同程度的抑制。在低于 0.8% 的 EMS 处理下,小球藻一周即可恢复生长,而当浓度为 1% 时需要 20 d 才能恢复正常生长。因此综合考虑小球藻恢复生长的时间及比生长速率和 EPA 含量变化,得到最佳诱变剂 EMS 的浓度为 0.8%。

2.2 诱变后优良藻株的选育

2.2.1 尼罗红染色进行初筛 尼罗红是一种亲脂性的恶嗪类荧光染料,能与脂类物质结合,在一定的激发波长下发射出脂特异性荧光,通过检测脂荧光强度即可测定细胞中的油脂含量。荧光显微镜观察比较细胞内油珠的大小、数量,荧光强度判断微藻油脂含量高低,作为富油微藻初筛的指标,简便快速。对分离得到的微藻进行尼罗红染色,观察荧光强度。

从图 2 看出,筛选得到的诱变藻株,其细胞明显大于对照组的微藻,脂肪粒大小和数量也比对照组提高,这与气象色谱测定的脂肪酸含量提高相一致。

2.2.2 通过比生长速率及 EPA 含量进行筛选 经过预实验的最佳诱变剂量诱变后,利用单细胞分离技术,初筛、复筛得到 1 株生长较快、脂肪酸含量较高的藻株,以诱变剂名称及微藻名称的首字母命名为 EC1。其 EPA 含量及比生长速率如图 3、图 4。

通过挑取 200 个藻落,根据生长情况及含脂量,筛选得到一株突变藻。从图 3 看出,选育出的藻株

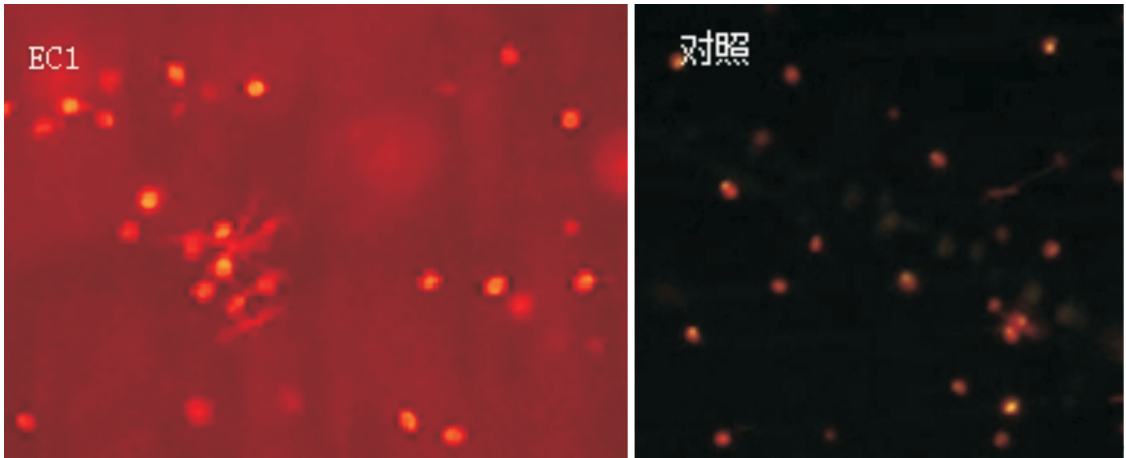


图 2 诱变藻株油脂的荧光定性分析(10×20)

Fig. 2 Oil fluorescence qualitative analysis of mutagenesis algae strains

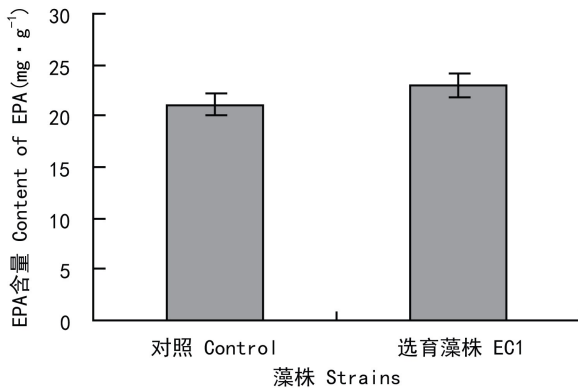


图 3 诱变后选育藻株的 EPA 含量

Fig. 3 EPA contents of EC1

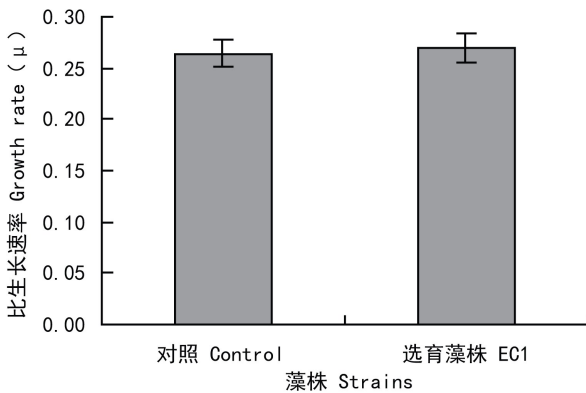


图 4 诱变后选育藻株的比生长速率

Fig. 4 Cell growth rate of EC1

EPA 含量较高,为 $22.95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 比对照组提高 8.97%。从图 4 看出,诱变后的微藻恢复生长后,比生长速率与对照组相似,说明诱变剂的后效作用不

是很明显。

2.3 对选育出的藻株进行培养条件的优化

2.3.1 氮源对诱变藻株产 EPA 的影响 小球藻的生长主要受氮和磷的影响,氮源不仅影响细胞的生长速度,而且还严重影响细胞内活性物质的合成积累。本研究考察了氮源浓度对诱变藻株产 EPA 的影响(图 5)。

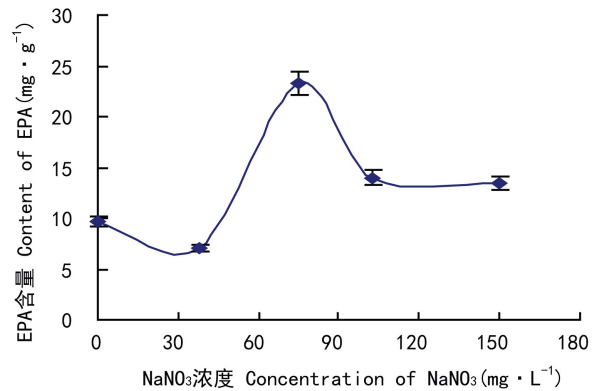


图 5 NaNO_3 对小球藻诱变株产 EPA 的影响

Fig. 5 Influence of NaNO_3 on EPA production of EC1

从图 5 可以看出,在一定浓度范围内,随氮源浓度的增加脂肪酸积累量增大,在 NaNO_3 浓度为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,EPA 的积累量达到最大,此后随 NaNO_3 浓度增加,EPA 含量降低。通过方差分析得到 P 值为 0.064,说明氮源对 EC1 的影响不显著。

2.3.2 pH 值对诱变藻株产 EPA 的影响 pH 值对小球藻的生长及生化组分有着重要的影响作用。一般认为海洋微藻生长的最适 pH 与海水的 pH 相同,在

6.5~8.5 之间(图 6)。

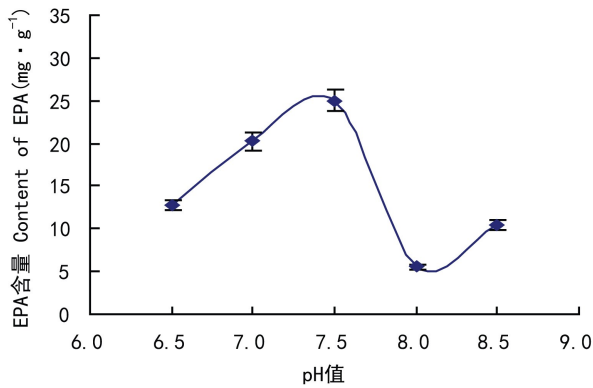


图 6 pH 值对小球藻诱变株产 EPA 的影响

Fig. 6 Influence of pH on EPA production of EC1

从图 6 看出, 诱变株产 EPA 的较适 pH 值为 7.5。在较适 pH 条件下 EC1 的 EPA 含量为 24.98 mg · g⁻¹, 通过方差分析得到 pH 对诱变株 EPA 的产量影响呈显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3.3 温度对诱变藻株产 EPA 的影响 海洋微藻的较适生长温度一般为 20~30 °C, 但产 PUFAs 的较适温度因藻种而异, 一般情况随温度的降低脂肪酸不饱和度增加, 因为在低温条件下, 藻类需通过生产更多的 PUFAs 来维持细胞膜的流动性(杨官品等, 2005)。通过实验发现小球藻的耐受温度较高, 在 30 °C 条件下也能正常生长(图 7)。

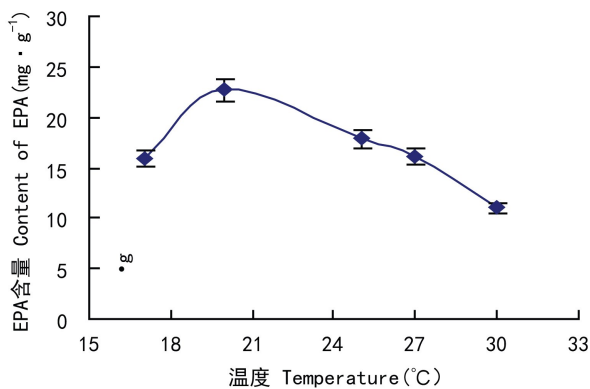


图 7 温度对小球藻诱变株产 EPA 的影响

Fig. 7 Influence of temperature on EPA production of EC1

由图 7 可知, 低温有利于 EPA 的积累, 筛选获得的诱变藻株在 20 °C 条件下 EPA 的含量最高, 为 22.66 mg · g⁻¹。通过方差分析, 发现温度对 EPA 的产量影响差异性不显著 ($P > 0.09$)。

2.3.4 环境条件的正交组合对诱变株产 EPA 的影响

不同的培养条件对微藻中 EPA 含量的影响见直观分析见表 2。由表 2 可知, 影响 EC1 产 EPA 的因素主次顺序是培养天数 > 接种量 > 昼夜温度, 根据 K 值得到产 EPA 的最优组合为 17~15 °C、接种量 12%, 培养 7 d。

表 2 培养条件对 EC1 产 EPA 的影响

正交试验结果及直观分析

Table 2 Results of orthogonal test of culture conditions on EC1 produce EPA and direct analysis

实验号 Code	水平 (Level)			EPA 产量 EPA production (mg · g ⁻¹)
	昼夜温度 Temperature of day-night (°C)	接种量 Inoculum dose (%)	培养天数 Culture days (d)	
1	17~15	8	7	21.43
2	17~15	10	10	15.33
3	17~15	12	13	24.66
4	20~18	8	10	13.90
5	20~18	10	13	13.45
6	20~18	12	7	24.93
7	23~21	8	13	16.94
8	23~21	10	7	15.97
9	23~21	12	10	13.14
E k ₁	20.473	17.423	20.777	
C k ₂	17.427	14.917	14.123	
I k ₃	15.350	20.910	18.350	
R	5.123	5.993	6.654	

2.4 遗传稳定性分析

鉴于诱变藻株的性状常常不稳定, 尤其在连续继代培养时, 为了检测所得藻株的性状是否稳定, 连续转接 6 代, 测定第一代和第六代的 EPA 含量(图 8)。

由图 8 可知, 这诱变株第一代和第六代的 EPA 产量变化不显著 ($P = 0.16$), 说明选育的变异藻种具有良好的遗传稳定性。

3 讨论

小球藻是较早用于人工培养且培养方法比较成熟的藻种, 具有生长快、繁殖迅速、易培养、营养丰富等特点。其多不饱和脂肪酸含量较高, 在一般的培养条件下, EPA 占总脂肪酸的 14.8% (梁英等, 1999)。Tripathi et al (2001), 使用 EMS 浓度 0.12%~0.48%, 处理雨生红球藻 1 h, 致死率为 34%~80%。本实验中使用 0.2%~1.0% 的 EMS 处理, 处理时间 30 min, 致死率在 20%~90%。由此可见, 致死率结果相差较大。这可能与藻种自身有关: 不同品系的

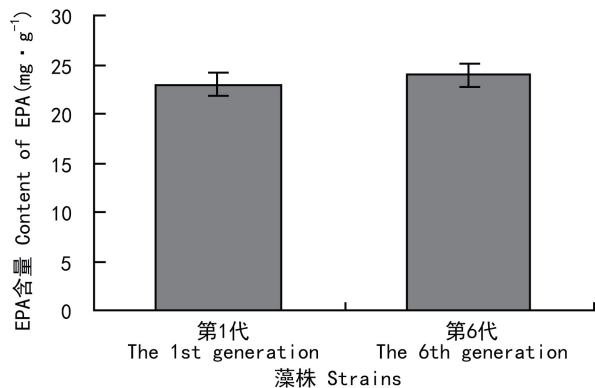


图8 诱变藻株第1代与第6代的EPA含量比较

Fig. 8 EPA content comparison of the 1st generation and the 6th generation mutagenesis algae strains

绿藻,对EMS的耐受能力不同;即使是同一品系处理时藻细胞的生长状态不同,或处理方法不同,得到的致死率存在差异。因此在EMS诱变育种工作中,首先要测定实验的藻种对EMS的耐受程度,根据实验结果确定合适的诱变剂量和诱变时间后再进行诱变筛选实验。本研究对小球藻进行EMS诱变,得到的较适浓度为0.8%,致死率82.4%。

将在最适条件下诱变得到的藻液进行划线分离筛选,获得1株油脂产量较高的藻株,命名为EC1,其EPA产量为 $22.95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,比对照组提高了8.97%。本研究发现,较低的氮源浓度有利于脂肪酸的积累,这与Ghulam et al (2012)的研究相一致。本研究发现,诱变株产EPA的较适pH为7.5,这与Pahl et al (2010)认为海洋藻最适生长pH为7.2~8.1的结果相似。通过条件优化得到EC1的最佳培养条件为 NaNO_3 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.5,昼夜温度为17~15℃,接种量12%、培养7d。在此条件下培养,诱变株EC1的比生长速率为0.260 4, EPA产量为 $25.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

通过遗传稳定性试验分析可知这株诱变藻第一代和第六代的EPA产量变化不显著($P=0.16$),这说明选育的变异藻种具有良好的遗传稳定性。

参考文献:

CHEN BL, 2011. Effects of phosphorus and silicon on the growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricoratum* [D]. Qingdao: Ocean University of China: 52-55. [陈百灵, 2011. 磷硅对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学: 52-55.]

CHEN W, WANG BG, LI XD, et al, 2010. Extraction and enrichment of polyunsaturated fatty acids from microalga *Chlorella* spp. [J]. J Dalian Ocean Univ, 25(3): 275-280. [陈炜, 王

保刚, 李晓东, 等, 2010. 从小球藻中提取和富集多不饱和脂肪酸的研究 [J]. 大连海洋大学学报, 25(3): 275-280.]

CHEN W, ZHANG C, SONG L, et al, 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. J Microbiol Meth, 77(1): 41-47.

ELSEY D, JAMESON D, RALEIGH B, et al, 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids [J]. J Microbiol Meth, 68(3): 639-642.

GENICOT G, LEROY JL, SOOM AV, et al, 2005. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes [J]. Theriogenology, 63(4): 1 181-1 194.

LIANG Y, BEARDALL J, HERAUD P, 2006. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricoratum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) [J]. J Photochem Photobiol B-Biol, 82(3): 161-172.

LIANG Y, MAI KS, SUN SC, et al, 1999. Effects of different nutrition concentrations on the growth of *Phaeodactylum tricoratum* [J]. Trans Oceanol Limnol, (4): 43-47. [梁英, 麦康森, 孙世春, 等, 1999. 不同的营养盐浓度对三角褐指藻生长的影响 [J]. 海洋湖沼通报, (4): 43-47.]

MOAZAMI N, RANJBAR R, ASHORI A, et al, 2011. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island [J]. Biomass Bioen, 35(5): 1 935-1 939.

MUJTABA G, CHOI W, LEE CG, et al, 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions [J]. Bioresour Technol, 123(4): 279-283.

OCTAVIO PG, ESCALANTE FME, DE-BASHAN LE, et al, 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products [J]. Wat Res, 45(1): 11-36.

PERNET F, TREMBLAY R, DEMERS E, et al, 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system [J]. Aquaculture, 221(1): 393-406.

PAHL SL, LEWIS DM, CHEN F, et al, 2010. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): Effect of some environmental factors [J]. J Biosci Bioeng, 109(3): 235-239.

TRIPATHI U, VENKATESHWARAN G, SARADA R, et al, 2001. Study on *Haematococcus pluvialis* for improved production of astaxanthin by mutagenesis [J]. World J Microbiol Biotechnol, 17(2): 143-148.

WANG N, WANG SY, SHI DQ, 2009. Advanced in induced mutation breeding of *Spirulina* [J]. Food Res Dev, 30(2): 139-141. [王妮, 王素英, 师德强, 2009. 螺旋藻诱变育种研究进展 [J]. 食品与研究开发, 30(2): 139-141.]

Xiang YF, Liu YZ, Li WX, et al, 2012. Application of EMS inducing mutation technique on soybean breeding [J]. Horticult Seed, 11(6): 12-15. [降云峰, 刘永忠, 李万星, 2012. 甲基磺酸乙酯诱变技术在大豆育种上的应用 [J]. 园艺与种苗, 11(6): 12-15.]

Yang GP, Zhang JM, Wei D, et al, 2002. Obvious increase of EPA content of *Nannochloropsis oculata* achieved in temperature stresses [J]. Acta Oceanol Sin, 24(4): 132-136. [杨官品, 张继民, 魏东, 2002. 温度逆境处理提高拟微球藻EPA含量的研究 [J]. 海洋学报, 24(4): 132-136.]

Yang SJ, Wang XS, Li JF, et al, 1988. The preliminary exploration of *Spirulina* culture [J]. J Beijing Agric Univ, 14(1): 71-74. [杨世杰, 王希善, 李继芬, 等, 1988. 螺旋藻培养初探 [J]. 北京农业大学学报, 14(1): 71-74.]