

# 海带雌性配子体克隆细胞的超低温保存实验

刘 涛<sup>1</sup>, 张 静<sup>1</sup>, 孟祥红<sup>1</sup>, 王翔宇<sup>1</sup>, 崔竞进<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**关键词:** 海带; 配子体克隆; 超低温; 种质保存

中国分类号: S985

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2006)02-0175-03

## 1 引言

生物种质资源保存的超低温冷冻保存技术在国内已进行了广泛的研究<sup>[1]</sup>, 在藻类种质保存工作方面, 绿藻、硅藻、蓝藻<sup>[2-6]</sup>以及紫菜<sup>[7-9]</sup>的超低温保存工作也取得了良好的进展。

海带配子体(克隆)是一种以有丝分裂方式进行细胞增殖的微小藻体, 并可通过两性生殖或单性生殖发育成大型叶状体。目前, 海带种质资源保存技术主要是海带配子体(克隆)的低温弱光保存<sup>[10, 11]</sup>, 通过低温(4℃)和弱光[1~2 E $\mu$ mol/(cm<sup>2</sup>·s)]来抑制海带配子体克隆细胞的生长和发育, 使其进行缓慢的有丝分裂, 以达到长期保存的目的, 利用该技术保存的海带配子体及配子体克隆最长已达 26a 的时间(1978 年保存的“无性繁殖系 1 号”)。为进一步丰富和发展海带种质长期保存技术, 笔者进行了有关海带配子体克隆细胞超低温冷冻保存实验。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

海带雌配子体克隆, 由中国海洋大学海带种质资源库提供。

### 2.2 实验方法

利用超声波粉碎配子体克隆簇状体(方法同参考文献[12]), 制成 2~3 个细胞/分枝的细胞悬液, 将配子体克隆细胞悬液与 3% 褐藻酸钠溶液等体积混合制成 3% 混合溶液(海带配子体克隆细胞密度

约 10<sup>6</sup>个/cm<sup>3</sup>), 12℃下, 滴入 1 mol/dm<sup>3</sup> CaCl<sub>2</sub> 溶液中 7 min 形成胶囊, 取出后用吸水纸吸干表面水分, 4℃下用蔗糖溶液脱水 12 h, 吸干胶囊表面水分, 称重后分别装入冻存管, 一组加入蔗糖作为冻存保护剂, 另一组不加保护剂。

将冻存管装入提篮中放于液氮生物容器中(-40℃)平衡 15 min, 快速浸入液氮中。48 h 后, 将冻存管快速取出, 放入 35℃水浴中复温 3 min。

用载玻片将胶囊压碎, 然后在显微镜下统计海带配子体克隆细胞的存活率。细胞存活的标准是细胞质均匀, 染色体正常。

取超低温冻存 48 h 的胶囊溶于 1 mol/dm<sup>3</sup> 的 EDTA 溶液中, 2 000 r/min 离心 5 min, 将细胞悬浮于消毒海水(NO<sub>3</sub>-N 16 mg/dm<sup>3</sup>, PO<sub>4</sub>-P 1 mg/dm<sup>3</sup>, Fe<sup>2+</sup> 0.1 mg/dm<sup>3</sup>)中。温度 8~12℃, 光强 60 E $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s), 光周期 12 L: 12 D 条件下培养, 统计其生长发育情况。

该实验每组均设重复组, 实验统计各组 200 个细胞以上, 取平均值。

## 3 实验结果与讨论

海带配子体克隆-藻酸钙胶囊脱水率随着蔗糖浓度的升高而增加(见图 1), 在实验范围内, 7.2%~26.0% 的脱水率, 配子体克隆存活率为 2.4%~19.5%, 且在加入蔗糖保护剂的实验组存活率高于不加蔗糖保护剂的对照组(见图 2)。

一般认为, 在冷冻保存中, 细胞内及细胞外冰晶

收稿日期: 2005-04-02; 修订日期: 2005-09-01.

资助项目: 国家自然科学基金资助(40406027); 山东省中青年科学家奖励基金(2005B507001)。

作者简介: 刘 涛(1975—), 男, 黑龙江省牡丹江市人, 主要从事藻类遗传育种研究。E-mail: liutao@ouc.edu.cn.

的生成,可造成细胞膜及细胞器的伤害,致使细胞死亡.而冻存保护剂可提高培养液浓度或细胞质浓度,减少降温或复温过程中细胞内、外冰晶生长对细胞的伤害.如何避免细胞内冰晶的生长是进行超低温保存实验的关键.对于超低温保存种质材料而言,保持细胞旺盛的生长和代谢,一方面可提高细胞抗逆性,一方面可提高细胞质的浓度,降低细胞含水量.另外,选择合适的细胞内冻存保护剂(如 DMSO,甘油等),既即可使细胞适度脱水,又可提高细胞质浓度,减少细胞内冰晶的增长.另外,一些细胞外保护剂,如聚乙二醇、PVP 等,可提高细胞外溶液的浓度,减少细胞外冰晶的生长,可以提高冻存细胞的存活率.有关研究指出,蔗糖是一种“复合型”的冻存保护剂,其即可作为细胞内也可作为细胞外保护剂,本实验的结果基本上符合这一观点.本实验采取了与脱水浓度相同的蔗糖溶液作为细胞冻存保护剂,在 9.4% 的脱水率情况下细胞存活率是对照的 2.35 倍.而在脱水率为 13.3%~26%(蔗糖浓度为  $1 \text{ mol/dm}^3$ ) 时,实验组与对照组细胞存活率均显著下降,可能是由于过度脱水而导致细胞的大量死亡.

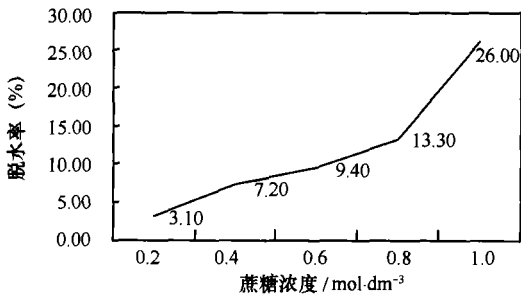


图 1 海带配子体-藻酸钙胶囊脱水比率

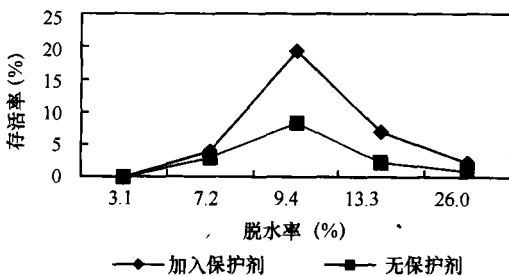


图 2 脱水率对海带配子体克隆存活率的影响

有关研究中发现,不同生理细胞分裂周期状态的海带配子体克隆细胞在进行超低温冷冻保存时,处于指数生长期的细胞冻后存活率较高,这可能与不同分裂周期生理状态下细胞的抗逆性和细胞质

浓度有关.为此,本实验选取指数生长期细胞进行保护剂浓度的实验.如图 3 所示,在脱水率为 10.1% 时,添加  $0.4 \text{ mol/dm}^3$  蔗糖作为冻存保护剂,冻存 48 h 后,海带配子体克隆细胞存活率可达 83.28%. 胶囊溶解后分离出海带配子体克隆细胞,在适宜的条件下进行了生长发育实验.图 4 显示,经超低温冻存后海带配子体克隆细胞 7 d 平均生长速率为 1.023~1.214, 14 d 排卵率为 3.71%~9.722%,差异不显著;而未经冻存细胞 7 d 的平均生长速率为 2.026, 14 d 排卵率为 47.54%. 可能是超低温冻存阻碍了细胞正常生理活动造成了两者的差异.另外,在超低温冻存实验中,尽管采取添加冻存保护剂、两步法细胞降温方法及快速复温等手段来减少细胞的伤害,但降温及复温过程中温度的剧变和冻存保护剂仍可能影响了细胞的活力,导致其与对照实验组在细胞生长速率和排卵率的明显差异.

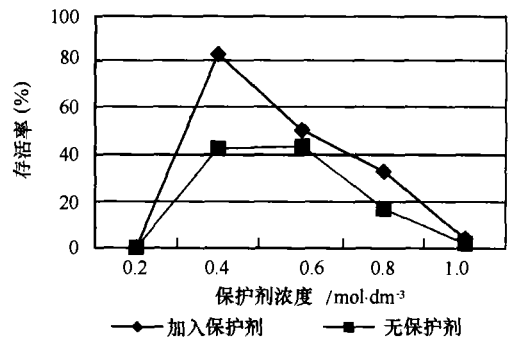


图 3 保护剂浓度对冻存配子体克隆细胞存活率的影响(脱水率 10.1%)

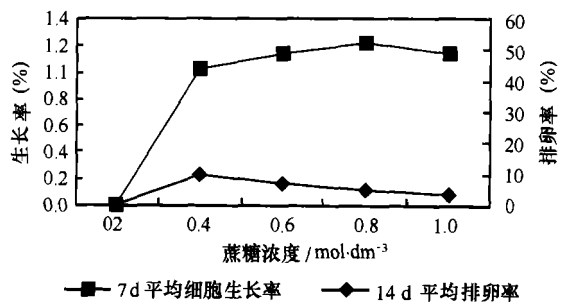


图 4 冻存细胞复苏后生长发育情况

在高等植物的组织冷冻保存中,通常利用褐藻藻酸钙作为胶囊胶包裹进行分生组织的超低温冻存,而褐藻酸胶正是海带及海带配子体(克隆)细胞

骨架的主要成分, 根据本实验的结果, 可以认为褐藻酸钙结合蔗糖溶液可以对海带配子体克隆细胞进行有效的冻存保护; 另外, 利用褐藻酸钙胶囊进行脱水, 可有效的控制细胞脱水率, 提高细胞质浓度. 虽然在培养实验中, 冻存细胞的生长速率和发育率相对较低, 但如延长其恢复培养时间, 相信可以恢复到

冻存前的正常生长发育水平.

种质保存工作的重点在于遗传资源的完整性和可利用性, 如何完善种质超低温保存技术, 实现其对种质资源“安全”的长期保存将是一项重要而艰巨的工作. 尤其是对于超低温保存的海带种质保存质量评价工作方面, 仍需要深入的探索.

## 参考文献:

- [1] 罗士韦, 唐 惕. 植物组织和细胞的超低温保存及种质库建立的研究现状[J]. 细胞生物学杂志, 1983, 5(1): 1- 7.
- [2] HOLM-HANSEN O. Viability of blue-green of algae after freezing[J]. Plant, 1963, 16: 530- 539.
- [3] HWANG S W, HUDOCK C A. Stability of *Chlamydomonas reinhardtii* in liquid nitrogen storage[J]. J Phycol, 1979, 7: 300- 303.
- [4] TAKANO M, SADOJM J, OGAWA T, et al. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*[J]. Cryobiol, 1973, 10(15): 440-444.
- [5] MORRIS G J. The cryopreservation of *Chlorella*: . Interaction of rate of cooling, protective additive and recovery rate[J]. Arch Microbiol, 1976, 107: 57-62.
- [6] NORMAN M S. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing[J]. Cryobiol, 1978, 15(15): 563-568.
- [7] 陈国宜, 阙求登. 红藻一坛紫菜果孢子的液氮保存[J]. 植物生理学通讯, 1988, (2): 32-34.
- [8] 陈国宜, 阙求登. 几种红藻孢子的超低温保存[J]. 热带海洋, 1988, 8(1): 67-72.
- [9] 陈国宜. 条斑紫菜果孢子的液氮保存[J]. 水产学报, 1989, 13(4): 356-359.
- [10] 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带配子体无性繁殖系培育成功[J]. 科学通报, 1978, 2: 115-116.
- [11] 崔竞进, 欧毓麟. 弱光保存海带配子体的初步实验[J]. 山东海洋学院学报, 1979, 1: 133-137.
- [12] 刘 涛, 朱名壮, 包振民, 等. 超声波对海带配子体克隆的作用[J]. 海洋湖沼通报, 2000, 86(4): 39- 44.

## Studies on ultralow cryopreserving female gametophytes clone of *Laminaria japonica*

LIU Tao<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, MENG Xiang-hong<sup>1</sup>, WANG Xiang-yu<sup>1</sup>, CUI Jing-jin<sup>1</sup>

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Key words:** *Laminaria japonica*; clone of gametophyte; ultralow cryopreservation; idiomorph resource