



# 条斑紫菜果孢子的液氮保存\*

## PRESERVATION OF CARPOSPORES OF LAVER IN LIQUID NITROGEN

陈国宜

Chen Guoyi

(上海水产大学)

(Shanghai Fisheries University)

随着生物工程学的发展,在超低温下( $-196^{\circ}\text{C}$ )保存生命有机体变得越来越重要。在超低温下生命活动几乎停止,变异的频率降到很低的程度,可以提供稳定的种质<sup>[6]</sup>。超低温保存生物体不需大量人力和物力,也不需要巨大的空间,是种质保存的一种好形式。Finkle, B. J. 等报道,到1985年止,至少有40多种高等植物的组织、器官或细胞培养物在 $-196^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存而不失去活力<sup>[6]</sup>。Stanwood 利用特殊的液氮贮存器保存300多种植物种子<sup>[9]</sup>。在藻类方面报道成功保存培养物的资料也很多,其中Hwang, S. W. 等人从1969年保存22种单细胞藻类达6—8年之久<sup>[7]</sup>。陈国宜, 阙求登在液氮中成功保存坛紫菜果孢子和海萝的四分孢子<sup>[8]</sup>,并提出用超低温保存法建立海藻孢子库的设想。为实现该设想,扩大保存材料种类,最近我们研究了条斑紫菜果孢子的超低温保存后的活力及再应用到生产上的可能性。结果报告如下。

### 材料与方 法

1. 果孢子的采集与处理 从江苏省启东县养殖架上选择果孢子成熟的条斑紫菜作为种菜,阴干后置于 $-10^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。果孢子放散及采集应用以前的方法<sup>[1]</sup>。果孢子收集到2ml塑料离心管中,加入保护剂即可试验。与此同时用另一支离心管的孢子计数孢子在冷冻前的自然死亡率。

2. 冷冻保护剂的配制 冷冻保护剂浓度采用重量体积百分比浓度(W/V%),用比重1.020的海水配制。本试验所用的保护剂种类及浓度如下:

单一保护剂: 5%, 10%, 15% DMSO (二甲亚砜)

混合保护剂: 1. 10% DMSO + 8% G (葡萄糖) + 10% PEG (聚乙二醇)。

2. 40% PG (丙二醇) + 10% G

3. 40% PG (丙二醇) + 10% PEG

3. 超低温保存程序 超低温保存程序有快速冷冻和缓慢降温两种。前者是将保存材料直接投入液氮中保存。缓慢降温程序是采用自制的降温装置控制材料降温速度,从室温降至 $0^{\circ}\text{C}$ 为 $2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,在 $0^{\circ}\text{C}$ 停留10—15分钟,在 $-1^{\circ}\text{C}$ 以下的降温,以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 左右的速率降至 $-60^{\circ}\text{C}$ ,然后投入液氮中保存。解冻复温采取四种不同方法。第一种是用 $40^{\circ}\text{C}$ 左右的水浴,第二种是用 $30^{\circ}\text{C}$ 左右的水浴,第三种是放在 $16-20^{\circ}\text{C}$ 的室温下,第四种是置于 $5^{\circ}\text{C}$ 左右的冰箱中。在这四种条件下材料一旦全部冰融,复温过程就告完成。

\* 上海水产大学1988届毕业生耿绪云参加本研究。丝状体生产性培养在江苏省启东县国营养殖场进行,该场技术员张奎参加培养与采苗工作。在此一并致谢。

收稿年月:1988年8月;1989年4月修改。

4. 孢子存活率检查 按以前的方法确定孢子存活率<sup>[1]</sup>。由于未冷冻前种菜放散的孢子具有一定程度的自然死亡率( $dn$ ),因此,计算冷冻后的存活率( $S$ ),需考虑冻前自然死亡率。

$$S = S'(1 + dn) \quad (1)$$

这里  $S'$  为显微镜检查冻后孢子存活率,  $dn$  为冻前孢子自然死亡率,  $S$  为冷冻实际存活率。

5. 保护剂的毒性试验 在孢子液中加入被试验的保护剂,从室温移到  $0^{\circ}\text{C}$  左右的冰箱中放置 30 分钟,然后除去保护剂,计数死亡孢子数和总孢子数,求出死亡率  $D'$ ,再按下式计算保护剂毒性引起孢子死亡率  $D$

$$D = D' - dn \quad (2)$$

6. 孢子萌发率试验 将刻有定点标志的玻璃片放在培养皿内,加入适量果孢子及海水,让其附着 2 个小时后,定点检查活孢子数,然后在室温  $20^{\circ}\text{C}$ , 光强  $1000 \sim 2000 \text{Lux}$ , 光:暗周期 14:10 小时条件下培养 4~5 天,再计数萌发孢子数,求其萌发率。

## 结 果

1. 果孢子在离心前后的死亡率 因为果孢子在超低温保存前经过离心收集,而离心收集过程是否会引起孢子的死亡,以前是不知道的,所以我们进行了离心前后孢子死亡率的测定,结果如表 1,其结论是差异不显著。

表 1 离心前后条斑紫菜果孢子死亡率比较  
Table 1 The effect of centrifugation on the death percentage of carpospores of *Porphyra yezoensis*

实验处理	实 验 值				平均 值
离心前死亡率	6.3	3.7	5.7	6.0 ( $n=4$ )	$5.4 \pm 1.2$
离心后死亡率	7.5	4.7	6.1	6.7 ( $n=4$ )	$6.3 \pm 1.2$
差异显著性判别	$F_x(3,3) = 9.28, \quad \therefore F = 1.0 < F_x(3,3)$ $x$ 取 0.05, $t_x/2 = 1.22, \quad \therefore t = 0.054 < t_x \cdot 2$				$\therefore$ 方差齐性 $\therefore$ 接受 $H_0$ .

由表 1 可以看出,果孢子经离心后死亡率有所升高,但经统计学判别,可判定果孢子死亡率在离心前后无显著变化。这样,前面方法中计算孢子存活率和毒性死亡率的公式(1)(2)才有可靠的根据。

2. 不同低温保护剂的保护效果 比较了在快冻与慢冻条件下,不同保护剂的保护效果,结果见表 2。在快冻条件下,以 40%EG + 10%G 保护效果最好,存活率达 57.7%,比不加保护剂的对照组(快冻)高出 20%,但只接近慢冻对照组的存活率。单独以 DMSO 作保护剂的各种浓度快冻组,随 DMSO 浓度提高,存活率也上升,最高者达 51.1%。在慢冻组中,单独用 10%DMSO,或 10%DMSO + 8%G + 10%PEG 的混合保护剂,保存效果都很好,果孢子存活率均在 90%以上。以 40%EG + 10%PEG 作为保护剂,效果最差,果孢子存活率只有 49.4%。在毒性死亡率一栏中可以看出,该组保护效果差的原因是保护剂对果孢子有很强的毒害作用。

比较快冻与慢冻两种情况下的孢子存活率,可以看到,慢冻的保存效果优于快冻。

3. 不同融冰复温速率对果孢子存活率的影响 比较四种融冰复温速率对果孢子存活率的影响,结果表明,在不同融冰条件下所进行的复温过程,对果孢子的存活率无明显影响。见表 3。

4. 果孢子萌发率及生产性采苗 分别以 10%DMSO 和 10%DMSO + 8%G + 10%PEG 作保护剂,经冷冻保存后的果孢子与未冷冻孢子进行萌发率的对比试验。未冷冻对照组的萌发率比冷冻组略高,两种保护剂的冷冻组萌发率接近。见表 4。经观察,冷冻保存后的果孢子萌发生长的丝状体与未冷冻组的

表2 不同保护剂对条斑紫菜果孢子冷冻存活率的影响

Table 2 The effect of different cryoprotectants on the survival percentage of frozen carpospores of *P. yezoensis*

保护剂种类及浓度	对照组	DMSO			DMSO+G+PEG (10+8+10%)	PG+G (40+10%)	PG+PEG (40+10%)
		5%	10%	15%			
快冻存活率	37.8±7.1	38.4±1.6	40.7±1.0	51.1±7.0	36.8±2.2	57.7±4.7	56.8±4.8
慢冻存活率	58.2±7.6	75.6±2.7	90.5±4.7	79.6±3.1	94.4±3.6	72.2±1.4	49.4±2.2
毒性死亡率	—	—	0.73±0.34	0.60±0.35	1.5±1.2	10.5±5.4	60.9±3.0

表3 不同融冰复温速率对果孢子存活率的影响

Table 3 The effect of different thawing rate on the survival percentage of frozen carpospores of *P. yezoensis*

融冰条件	复温速率(℃ min)	实 验 值 (存活%)			平均值(存活%)
40℃ 水浴	115.4	96.1	95.0	84.5	91.8±6.4
30℃ 水浴	78.4	95.0	95.3	84.7	91.7±6.0
15℃ 室温	9.2	88.9	97.1	87.9	91.8±5.0
5℃ 冰箱	6.4	89.9	93.9	88.3	90.7±2.9

注:以 10% DMSO 作保护剂,冻存三天再复温。

表4 冷冻与未冷冻果孢子萌发率的比较

Table 4 Comparison of germination percentage between the frozen and unfrozen carpospores of *P. yezoensis*

实验处理	未冷冻组	冷 冻 组	
		10% DMSO	DMSO+G+PEG
萌发率(%)	67.1±13.1	59.2±3.3	55.9±4.7

丝状体没有什么变化。

为了探讨冷冻保存的果孢子进行生产的可能性,4月下旬在启东县国营海水养殖场利用冷冻保存后的果孢子与未冷冻的果孢子进行贝壳丝状体生产性采苗,两组的贝壳采苗面积均为 3M<sup>2</sup>。冷冻组投果孢子密度为 250 个/cm<sup>2</sup>,未冷冻组为 300 个/cm<sup>2</sup>。由于冷冻组投孢子密度小于对照组,加上冷冻后的孢子经离心作用结成团块,解冻复温后难以分散到单个孢子的水平,所以从贝壳丝状体的生长情况看,冷冻组比对照组藻落稀些。但从丝状体生长趋势估计,冷冻组的丝状体能达到生产要求。培养的两组丝状体至秋季,成熟度好,各组丝状体放散的壳孢子健壮,于 9 月 28 日分别采苗的紫菜网帘,紫菜尚在海区现场生长中。

## 讨 论

文献报道,DMSO,G,PEG 是超低温保存植物材料的常用保护剂,而且三者混合使用效果更好<sup>[4]</sup>。最近我们单独使用 DMSO 超低温保存坛紫菜果孢子<sup>[2]</sup>和其他红藻孢子<sup>[3]</sup>都得到良好的保护效果。现在我们在条斑紫菜果孢子冷冻保存中,DMSO 单独使用或与 G,PEG 混合使用都能获得 90% 以上的存活率,而且混合使用,似乎效果更佳,这证明在多种红藻孢子超低温保存中 DMSO 有普遍的使用价值。在

人类白细胞超低温保存中有资料介绍 40%EG + 10%G 或 40%EG + 10%PEG 都有很好的保护效果,然而我们的试验证明,在快冻条件下,这些化合物保护效果是好的,但在慢冻条件下效果不佳,根据毒性试验分析,是由于这些化合物对孢子有较大毒性的原故。

冷冻保存生物材料的保护剂必须在使用范围无毒。而这种毒性,推测在未结冰状态(如我们在 0°C 试验的)与结冰进行过程可能是不一样的。后一状态下产生的毒性,我们无法测出,所以本试验测定毒性的资料只供参考用。

在我们的试验中,快冻比慢冻的孢子存活率显著低得多,这与大多数研究结果相一致<sup>[8]</sup>。在快冻中孢子所含自由水不能及时排出细胞,冷冻时形成胞内冰,引起细胞机械损伤,使孢子死亡,即使提高很高浓度保护剂也只能达到 50%存活率。缓慢降温能使孢子适当脱水,有效阻止胞内冰的形成,所以有较高的存活率。这也就是慢冻法被广泛应用的原因。

关于融冰复温速率对果孢子存活率没有明显影响,这与 Norman, M. S. 在盐沼藻类的液氮保存中的结果是一致的<sup>[9]</sup>。这是由于缓慢降温到 -60°C 时,孢子得到充分脱水,胞内溶液十分浓稠,在解冻复温时,无论复温速度如何,不会出现重结晶,从而避免机械损伤。

经液氮冷冻保存的果孢子萌发率略低于未冷冻组,可能是由于冻害的延续作用。但从冷冻果孢子萌发成丝状体以及生产性采苗试验看,超低温保存的果孢子再用于生产是可行的。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 陈国宜,1980。关于坛紫菜自由丝状的培养与直接采苗的研究。水产学报,4:19-29。
- [ 2 ] 陈国宜,阙求登,1988a。红藻——坛紫菜果孢子的液氮保存。植物生理通讯,(2):32-34。
- [ 3 ] 陈国宜,阙求登,1988b。几种红藻孢子的超低温保存。热带海洋,8(1):67-72。
- [ 4 ] 简令成等,1987。甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究。植物学报,29(2):123-131。
- [ 5 ] 曼特尔 S. H ; H. 史密斯(朱激等译),1983。植物生物工程学,165-265。上海科学技术出版社。
- [ 6 ] Finkle, B. J. et al., 1985. Cryoprotective Compounds in the viable freezing of plant tissues. In «Cryopreservation of plant cells and organs.»Kantha, K. K. CRC press p75-113.
- [ 7 ] Hwang, S. W. and Hudock, G. A., 1971. Stability of *Chlamydomonas reinhardtii* in liquid storage. *J. Phycol.*, 7: 300-303.
- [ 8 ] Norman, W.S., 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology.*, 15: 563-568.
- [ 9 ] Standwood, P. C., 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In «Cryopreservation of plant cells and organs» Kantha, K. K. CRC press. p199-226.

上接第 355 页 (continued from page 355)

- [ 3 ] 朱 洗、王幽蒲,1962。金鱼和鳊鱼卵球成熟的细胞学研究。实验生物学报,8(1):1-33。
- [ 4 ] Aida, et al, 1973. Physiological studies on gonadated Maturation of Fishes, I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 39 (11): 109.1-1106
- [ 5 ] Zwarenstein, H., 1937. Experimental induction ovulation with progesterone. *Nature*. 139: 112.